

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN OVARYAN FOLİKÜLLERİNDE RADYASYONA BAĞLI
APOPTOZİS ÜZERİNE SHİLAJİTİN ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Mete KEÇECİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH

ZONGULDAK

2014

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN OVARYAN FOLİKÜLLERİNDE RADYASYONA BAĞLI
APOPTOZİS ÜZERİNE SHİLAJİTİN ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Mete KEÇECİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH

ZONGULDAK

2014

TEZ ONAY TUTANAĞI

Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi

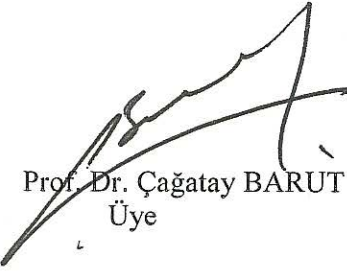
Tez Başlığı : Sıçan Ovaryan Foliküllerinde Radyasyona Bağlı Apoptozis Üzerine Shilajitin Etkileri

Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Mete KEÇECİ

Tez Savunma Tarihi : 11/04/2014

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH


Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Çağatay BARUT
Üye


Yrd. Doç. Dr. Kanat GÜLLE
Üye

UYGUNDUR
16/06/2014


Prof. Dr. Mustafa AYDIN
Dekan Vekili



ÖNSÖZ

Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince hiçbir konuda desteğini esirgemeyen ve beni teşvik edip yönlendiren sayın hocalarıma, başta tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH'a, ayrıca eğitimim süresince destek ve katkılarını esirgemeyen, Sayın Yrd. Doç. Dr. Kanat GÜLLE'ye, tez çalışmalarım da katkıları olan Yrd. Doç. Dr. Bekir Hakan BAKKAL, Yrd. Doç. Dr. Ercan GENCER ve Yrd. Doç. Dr. Füzünan KÖKTÜRK'e en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Aynı ortamı paylaştığım ve bu tez çalışmasında bana destek olan ark.m Araş. Gör. Dr. Fatma Zehra YÜCE'ye ve Doktora öğrencisi ark.m İbrahim PALA ve Bayram KAMAT'a teşekkür ederim. Son olarak bu çalışmada ve uzmanlık eğitimim boyunca yardımını eksik etmeyen sevgili eşim, biricik oğlum ve aileme anlayış ve destekleri için sevgiyle teşekkür ederim.

Dr. Mete KEÇECİ
ZONGULDAK, 2014

ÖZET

Mete Keçeci, Sıçan Ovaryan Foliküllerinde Radyasyona Bağlı Apoptozis Üzerine Shilajitin Etkileri, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Tezi. Zonguldak, 2014.

Ovaryumdaki folikül dejenerasyonu iyonize radyasyon tarafından hızlandırılır. Radyasyon ovaryan dokuda bir taraftan oksidatif stres yaratırken diğer taraftan intrinsek apoptotik yolağı tetikler.

Geleneksel Hint tıbbı başta olmak üzere birçok kültürde geleneksel tedavi yöntemlerinin bir parçası olarak asırlardır kullanılmakta olan shilajit; özellikle yaz aylarında Himalayalar, Hindikuş, Pamir ve Urallar gibi dağlık bölgelerde, 1000 ila 5000 metre yükseklikte kaya köklerinden sızan ve çok sayıda organik ve inorganik maddenin bileşiminden oluşan doğal bir üründür. Shilajit'in serbest oksijen radikal süpürücü etkisi güncel raporlarda gösterilmiştir. Yine shilajit'in sıçanlarda oosit proliferasyon ve diferansiyasyonunu başlattığı ve diöstrusu kısaltarak ovülasyon frekansını arttırdığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda; 40 adet prepubertal dişi Wistar albino sıçan, biri kontrol grubu olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Shilajit ve radyasyon+shilajit gruplarındaki sıçanlara gün aşırı oral yoldan 100 mg/kg shilajit verilmiş, radyasyon ve radyasyon+shilajit grubundakiler ise 8,3 Gy tüm vücut iyonize radyasyona maruz bırakılmıştır. İrradyasyondan sonraki 4. günde sakrifiye edilen sıçanların ovaryumları toplanmıştır. Shilajit grubunda kontrol grubuna göre ve radyasyon+shilajit grubunda radyasyon grubuna göre daha yüksek primordial folikül sayısı gözlenmiştir. Yine özellikle radyasyon+shilajit grubundaki ileri evre foliküllerin kısmen de olsa morfolojik bütünlüklerini korumuşlar ve erken evre apoptotik değişikliklerle uyumlu görünüm arz etmişlerdir. Shilajit verilen gruplarda oksidan-antioksidan dengenin olumlu yönde etkilendiği bulunmuştur. Yine p53, bax ve kaspaz 3 gibi apoptotik belirteçler için yapılan immunohistokimyasal boyamalarda shilajit verilen gruplarda ekspresyonların zayıfladığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Follikülogenez, İyonize Radyasyon, Oksidatif Stres, Sıçan Ovaryumu, Shilajit.

ABSTRACT

Mete Keçeci, Effects of Shilajit on Radiation-Induced Apoptosis in Rat Ovarian Follicles, Bülent Ecevit University Faculty of Medicine, Thesis in Histology and Embryology. Zonguldak, 2014.

Ovarian follicular degeneration is accelerated by ionizing radiation. In ovarian tissue, radiation creates oxidative stress, on the other hand it triggers the intrinsic apoptotic pathway.

Shilajit, a natural product that consists a combination of organic and inorganic materials, is being used as a part of traditional treatment systems mainly in traditional Indian medicine and especially in the summer, in the mountainous regions such as Himalayas, the Hindu Kush, Pamir and the Urals it exudes from roots of rocks which are from 1000 to 5000 meters high. Free radical scavenging effect of shilajit has been shown in the current reports. At the same time, it has been shown that shilajit induce oocyte proliferation and differentiation and increase the frequency of ovulation shortening diestrus.

In our study; 40 prepubertal female Wistar albino rats, including one in the control group were divided into 4 groups. Shilajit were given to rats in shilajit and radiation+shilajit groups in dose 100 mg/kg p.o., rats in radiation and radiation+shilajit groups were exposed to 8.3 Gy whole body ionizing radiation. 4 days after irradiation the rats were sacrificed and the ovaries were collected. It has been observed that shilajit group had much more primordial follicle number compared to control group and the situation was the same for the radiation+shilajit group compared to radiation group. What is more, advanced stages of follicles that are in radiation+shilajit group have partially saved their morphological integrity and they showed compatible appearance with early stage of apoptotic changes. It has also been found that the oxidant-antioxidant balance was affected positively in shilajit treated groups. Moreover, in immunohistochemical staining which was done for apoptotic markers like p53, Bax and caspase 3 expressions of these markers were observed to have weakened in shilajit treated groups.

Key Words: Apoptosis, Folliculogenesis, Ionizing Radiation, Oxidative Stress, Rat Ovary, Shilajit.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİL DİZİNİ	xi
TABLO DİZİNİ	xiii
GRAFİK DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Folikülogenez.....	5
2.2. İyonizan Radyasyon ve Serbest Radikaller İle İlişkisi.....	7
2.2.1. Radyasyonun ovaryan foliküller üzerine etkisi.....	10
2.3. Apoptoz.....	11
2.3.1. Apoptoz morfolojisi	19
2.3.2. Folikül atrezisi ve apoptoz	20
2.4. Shilajit	23
2.4.1. Shilajit'in geleneksel tıpta kullanımı	24
2.4.2. Shilajit'in etkileri üzerine prelinik ve klinik araştırmalar	25
2.4.2.1. Antioksidan aktivite	25
2.4.2.2. Antiülserojenik ve antiinflamatuvar aktivite.....	29
2.4.2.3. İmmünomodülatör aktivite.....	30
2.4.2.4. Antidiabetik aktivite.....	31
2.4.2.5. Antialerjik aktivite	33
2.4.2.6. Öğrenme, hafıza ve anksiyete üzerine etkiler	33
2.4.2.7. Spermatojenik ve oojenik etki.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Işık Mikroskopik İncelemeler	36
3.2. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü	37

3.3. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Analizi.....	38
3.3.1. Malondialdehit (MDA)	38
3.3.2. Total antioksidan kapasite (TAK).....	39
3.4. İstatistiksel Analiz.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	40
4.1.1. Kontrol grubuna ait ışık mikroskopik bulgular	40
4.1.2. Shilajit grubuna ait ışık mikroskopik bulgular.....	44
4.1.3. Radyasyon grubuna ait ışık mikroskopik bulgular.....	47
4.1.4. Radyasyon+shilajit grubuna ait ışık mikroskopik bulgular	51
4.1.5. Gruplara göre folikül sayılarının istatistiksel analizi	54
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	56
4.2.1. Kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	56
4.2.2. Shilajit grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	56
4.2.3. Radyasyon grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	57
4.2.4. Radyasyon+shilajit grubuna ait immunohistokimyasal bulgular.....	57
4.3. MDA ve Total Antioksidan Kapasite.....	61
4.4. Deneklerin Total Vücut Ağırlığında Meydana Gelen Değişiklikler.....	62
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇLAR	79
7. KAYNAKLAR	81
8. EKLER.....	102
Ek 1: Etik Kurul Onayı	102

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AOF	Akut ovaryan yetmezlik
Gy	Gray
LD 50	Letal doz 50
γ	Gamma
MDA	Malondialdehit
TAK	Total antioksidan kapasite
SOR	Serbest oksijen radikalleri
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
SOD	Süperoksit dismutaz
GPX	Glutasyon peroksidaz
CAT	Katalaz
PRDX	Peroksiredoksin
GST	Glutasyon-S-transferaz;
GSR	Glutasyon redüktaz
GSH	Redükte glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
HIV	Human immunodeficiency virus
STZ	Streptozosin
NO	Nitrik oksit
FSH	Folikül Stimulan Hormon
ZP	Zona Pellucida
LH	Luteinizan Hormon
H	Hidrojen
OH-	Hidroksil radikali
H₂O₂	Hidrojen peroksit
BER	Base-excision repair, Baz eksizyon onarımı
HO₂	Hidroperoksil
H₃O⁺	Hidronyum
GV	Germinal Vezikül
Diplot.	Diploten

kDa	Kilo Dalton
PARP	Poly(ADP) riboz polimeraz
ADP	Adenozin difosfat
CARD	Caspase Recruitment Domain
DED	Death Enhancer Domain
DD	Death domain
Fas	Fatty acid synthetase
FADD	Fas associated protein with death domain
DISC	Death Induced Signaling Complex
AIF	Apoptosis Inducing Factor
e⁻	Elektron
Smac/DIABLO	Second mitochondrial activator of caspase/direct IAP binding protein with low PI
HtrA2/Omi	High-temperature requirement protein A2
IAP	Inhibitors of Apoptosis Proteins
CAD	Caspase-Activated DNase
ICAD	Inhibitor of CAD
PARP	Poly ADP ribose polymerase
HPV	Human papilloma virus
H+E	Hematoksilen+Eozin
TNFR-1	Tümör nekroz faktör reseptör-1
ICE	Interleukin-1 β converting enzyme
KGF	Keratinocyte growth factor
HGF	Hepatocyte growth factor
IGF-1	Insulin like growth factor-1
VIP	Vasoactive intestinal peptide
GDF-9	Growth and differentiation factor-9
bFGF	Basic fibroblast growth factor
EGF	Epidermal growth factor
GH	Growth hormon
IL-1β	Interleukin 1 β
P4	Progesterone

PR	Progesterone receptor
O₂⁻	Süperoksit radikali
DNA	Deoksiribonükleik asit
SGOT	Serum glutamat oksalat transaminaz
SGPT	Serum glutamat pirüvat transaminaz
LDH	Laktat dehidrojenaz
CK	Kreatin kinaz
ISO	Isoproterenol
HDL	High density lipoprotein (yüksek yoğunluklu lipoprotein)
LDL	Low density lipoprotein (düşük yoğunluklu lipoprotein)
VLDL	Very low density lipoprotein (çok düşük yoğunluklu lipoprotein)
HIV	Human immunodeficiency virus

ŞEKİL DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: Radyasyonun direk ve indirek etkisi.....	8
Şekil 2: Serbest oksijen radikalleri ve antioksidan enzimler	9
Şekil 3: Fare, Çin hamster'ı ve gine domuzu oositlerinin genetik radyasyon duyarlılığı	10
Şekil 4: Fas reseptörü aracılı apoptozda DISC formasyonu ve kaspaz 3 aktivasyonu ...	13
Şekil 5: Siklin bağımlı protein kinaz sistemi	14
Şekil 6: Apoptozda gerçekleşen olayların özeti	17
Şekil 7: Apoptozdaki yolların şematik sunumu	19
Şekil 8: Ovaryan folikül devamlılığını evre bağımlı olarak düzenleyen faktörler.....	22
Şekil 9: Santimetre ölçeği ile resimlenmiş işlenmiş kaya shilajiti.....	24
Şekil 10: Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması.	41
Şekil 11: Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması..	42
Şekil 12: Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması.	42
Şekil 13: Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması.	43
Şekil 14: Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması.....	43
Şekil 15: Shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması.	44
Şekil 16: Shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması.	45
Şekil 17: Shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması.	45
Şekil 18: Shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması.	46
Şekil 19: Shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması.....	46
Şekil 20: Radyasyon grubuna ait kesitin H+E boyaması..	48
Şekil 21: Radyasyon grubuna ait kesitin H+E boyaması.	49
Şekil 22: Radyasyon grubuna ait kesitin H+E boyaması.	49
Şekil 23: Radyasyon grubuna ait kesitin H+E boyaması.	50
Şekil 24: Radyasyon grubuna ait kesitin H+E boyaması.	50
Şekil 25: Radyasyon+shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması.....	51
Şekil 26: Radyasyon+shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması.....	52
Şekil 27: Radyasyon+shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması.....	52
Şekil 28: Radyasyon+shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması.	53

Şekil 29: Radyasyon+shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması.....	53
Şekil 30: Tüm Gruplara ait ovaryum kesitlerinin PAS+HL boyanma görüntüleri. ...	54
Şekil 31: Tüm gruplarda p53 ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.	58
Şekil 32: Tüm gruplarda Bax ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.	59
Şekil 33: Tüm gruplarda Kaspaz ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.	60

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1: <i>C. Elegans</i> 'daki apoptotik genler ve bunların memelilerdeki homologları.....	11
Tablo 2: Foliküler apoptoza etki eden faktörler.....	21
Tablo 3: Deney grupları ve yapılan işlemler.....	36
Tablo 4: Ovaryan foliküllerin sınıflandırılmasında kullanılan kriterler.....	37
Tablo 5: Sağlıklı ve atretik folikül sayılarının gruplara göre dağılımı.....	55
Tablo 6: MDA ve total antioksidan kapasite değerleri.	61
Tablo 7: Günlere göre deney ağırlığı değişimi ve ağırlık değişim yüzdesi tablosu...	63

GRAFİK DİZİNİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
Grafik 1: Gruplara göre primordial folikül sayıları.....	55
Grafik 2: Gruplara göre atretik folikül sayıları.	56
Grafik 3: Gruplara göre MDA değerleri (ng/ml).	61
Grafik 4: Gruplara göre TAK değerleri (mmol/l).	62

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser gelişmiş ülkelerde çocuklardaki ölümlerin en yaygın ikinci nedenidir (1). En yaygın çocukluk çağı kanserleri lösemi, lenfoma, rabdomyosarkom, nöroblastom, Wilm's tümörü, santral sinir sistemi tümörleri ve germ hücreli tümörleri kapsar (2, 3). Bu kanserlerin çoğu kemoterapi, radyoterapi, ya da cerrahi tek başlarına ya da kombine kullanılarak tedavi edilebilir (2, 4).

Pediyatrik kanser tedavi protokollerindeki gelişmenin bir sonucu olarak, son otuz yılda çocukluk çağı kanserlerinde hayatta kalım oranları dramatik olarak iyileşmiştir (2).

Son derece başarılı olmalarına rağmen kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavilerin geç etkiler olarak adlandırılan komplikasyonları ortaya çıkmıştır (5). Geç etkiler tedavi sırasında ya da kısa süre sonra ortaya çıkıp kronik bir durum olarak devam etmektedir. Bunlar ayrıca tedavinin tamamlanmasından yıllar sonra da ortaya çıkabilmektedir (4). Geç etkiler; nörokognitif bozukluklar, iskelet deformiteleri, kardiyopulmoner, renal ve hepatik hasarların yanı sıra endokrin ve reproduktif disfonksiyonu da kapsayan bir dizi klinik durumu içerir (6).

Pubertal gelişim, fertilité ve gebelik için, normal hipotalamik, hipofizer, ovaryan ve uterin fonksiyonların yanı sıra yeterli ovaryan rezerv de gereklidir (2). Memeli ovaryumu belirli bir oosit stoğu içerir. Bu oosit stoğu yenilenemez ve kadının hayatı boyunca tüm üreme ihtiyaçlarını karşılamalıdır (7, 8). Ne var ki dışı üreme sistemi kanser tedavilerinin geç etkilerine oldukça hassastır (2).

Radyoterapi sırasında overler, lumbosakral saçılıma ek olarak abdominal, pelvik ya da total vücut ışınlamasının bir parçası olarak radyasyona maruz kalabilir (9, 10). Radyoterapi sonrasında ise bazı kanserli ya da normal dokularda yenilenme (bağırsaklar, testis, kemik iliği vs.) gözlenirken, miktarı fetal hayatta belirlenen ovaryan stokta, radyasyon etkisiyle yok olan germ hücreleri yenilenemezler (11).

İnsan overinde fertilizasyondan sonraki 5. ayda 6,8 milyon germ hücresi bulunur. Doğumda bu sayı 2 milyon'a ve puberte başlangıcında 300 bin'e düşer. Yani foliküllerin büyük çoğunluğu folikülogenez boyunca devam eden atrezi süreci ile kaybedilir. Oosit havuzunun bu yenilenemeyen doğası, onu oosit depresyonunu hızlandıran, erken ovaryan yetmezlik, reproduktif potansiyel kaybı ve genç

kadınlardaki prematür menapoz ile ilişkili sağlık problemlerine yol açan, dış ajan maruziyetine çok hassas kılar (12).

Foliküler atreziyi hızlandıran uyaranlardan biri de iyonize radyasyondur (13). Radyasyon hücrede apoptozu indükler (14) ve ovaryan fonksiyonları bozar (15). Sıçanlarda ve farelerde primordial oositlerin büyüyen foliküllerdeki oositlere göre radyasyona daha duyarlı oldukları rapor edilmiş olmakla birlikte (16) kemirgenlerin ovaryumlarında radyasyon etkisiyle tüm foliküler gelişim aşamalarında kayıplar olduğu gösterilmiştir (12).

Overlerdeki hasarın yaygınlığına bağlı olarak iki çeşit ovaryan yetmezlik ayırt edilebilir (17). Tedavi sırasında ya da hemen sonrasında ovaryan fonksiyonların kaybı akut ovaryan yetmezlik (AOF) olarak sınıflandırılır. Kanser tedavisinin tamamlanmasından sonra ovaryan fonksiyonların korunmasına karşın, 40 yaş öncesi menapoz gelişmesi ise prematür menapoz olarak sınıflandırılır (17, 18). Prematür menapoz reproduktif potansiyelin ve ovaryan seks hormonu yapımının erken ve beklenmedik bir şekilde kesilmesine yol açar. Bu nedenle, kanser tedavisi sonrası prematür menapoz gelişen hastalar, prematür menapoz gelişmeyenler ile karşılaştırıldığında osteoporoz (19, 20), kardiyovasküler hastalıklar nedeni ile ölüm (21) ve psikoseksüel disfonksiyon (22, 23) gibi çeşitli sağlık sorunlarının gelişimi açısından artmış risk taşırlar.

Epidemiyolojik olarak, radyoterapi sonrası ovaryan yetmezlik gelişme riski; hastanın yaşına, tedavi protokolüne (radyasyon dozu ve alanı gibi) ve malignitenin tipine bağlıdır (24). Stillman ve ark.tarafından yapılan bir çalışmada, (25) her iki overi de abdominal radyasyon uygulanan alanın dışında bulunan, 34 hastanın hiçbirinde ovaryan yetmezlik gelişmediği, overleri radyasyon alanının sınırında olan 35 hastanın 5'inde (% 14), ve overleri radyasyon alanı içinde kalan 25 hastanın 17'sinde (% 68) ovaryan yetmezlik geliştiği rapor edilmiştir.

Üçbin üçyüz doksan hastanın katıldığı bir çalışmada, hastaların % 70'inden fazlasında AOF geliştiği, 10 Gray (Gy) ve üzeri radyasyon dozlarının yüksek AOF riski ile 20 Gy ve üzerindeki dozların ise çok yüksek AOF oranları ile ilişkili olduğu saptanmıştır (17). Son zamanlarda overlerin 5 Gy gibi düşük dozlarda ışınlanması, muhtemelen ovaryan yetmezliğe bağlı olarak, gebelik oluşmaması için bir risk

faktörü olarak tespit edilmiştir (26). İnsan oositleri için LD 50 dozunun (oositlerin % 50'sini öldürmek için gerekli doz) 2 Gy'in altında olduğu düşünülmektedir (9, 27).

Gençlerde 5 Gy radyasyonun % 50 oranında steriliteye, 40 yaş üstü bireylerde ise, 1,5 Gy'lik uygulamanın fertilitede % 90 kayba neden olduğu bildirilmiştir (19).

Kemik iliği transplantasyonu öncesinde tüm vücut ışınlanması yapılmış puberte öncesi çocuklarda, cinsiyet karakterlerinin oluşması için hormon replasmanı gerekli görülmüş olup, bu hastaların puberte ile birlikte menstruel siklusları düzenli dahi olsa, gebeliklerinin erken döneminde spontan düşüklere meydana geldiği saptanmıştır (28, 29). Total vücut ışınlanması yapılmış lenfoma ve lösemi hastası çocuklarda da; gecikmiş puberte, sekonder cinsiyet karakterlerinin oluşmaması (30) ve implantasyon defektleri gözlenmiştir (28). Yapılan klinik çalışmalardan elde edilen veriler kısıtlı olsa da, deney hayvanlarıyla, özellikle de fareler ile yapılan çalışmalardan; iyonizan radyasyon maruziyeti nedeniyle genetik geçişli hastalıklar ve anomali riskleri üzerine kapsamlı veriler elde edilmiştir (12).

Çocukluk çağı kanser tedavilerindeki gelişmeler doğrultusunda, hastaların yaşam sürelerinin uzaması ile bu hastalarda fertilitenin korunması, daha da büyük önem kazanmıştır. Kanser tedavisi görenlerde fertilitenin korunması için iki ana yaklaşım mevcuttur. Birincisi ovaryan doku, oosit, ya da embriyoların dondurulması, ikincisi ise tedavi nedeniyle oluşacak hasarı en aza indirmek için uygulanan ovaryan transpozisyon (ooforopeksi) ve GnRH analogları gibi kemoprotektif ajanların kullanımınıdır (31). Hangi fertilitite koruyucu yaklaşımın kullanılacağı; hastanın yaşı, kanser tipi, mevcut zaman ve ovaryan metastaz riski gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (32). Embriyo dondurulması standart bir uygulama olarak kabul görmüştür ancak bunun çocuklarda uygulanması, partner gerektirmesi, ayrıca hormona duyarlı tümörlerde ve kemoterapiye hemen başlanması gereken durumlarda uygulanamayacak olan ovaryan stimülasyon gerektirmesi nedeniyle olası değildir. Ovaryan supresyon, ovaryan transpozisyon ve oosit ve ovaryan doku dondurulması gibi diğer yöntemler üzerinde araştırmalar devam etmektedir ve bunlar yalnızca belirli merkezlerde gerçekleştirilebilmektedir (32, 33). Bu nedenle çocukluk çağı kanser tedavileri sonrası fertilitenin korunması ile ilgili daha çok deneysel çalışma gerçekleştirilmesi kaçınılmazdır.

Yaptığımız literatür taramalarında; melatonin (13), sodyum selenit (34), sfingozin (35), curcumin (36) ve resveratrol (37) gibi antioksidanların radyasyon ile indüklenen ovaryan toksisite üzerine etkilerini inceleyen birçok çalışma olduğunu gözlemledik. Biz de çalışmamızda geleneksel Hint tıbbında yaygın olarak kullanılan ve modern bilimsel değerlendirmeler ışığında antioksidan aktivitesine ilaveten birçok tedavi edici özelliği de kanıtlanmış olan shilajit'in (38) radyasyona maruz bırakılmış sıçan ovaryumları üzerindeki koruyucu etkisini, öncelikle genel morfolojiyi değerlendirerek histopatolojik düzeyde, primordiyal folikül rezervini histomorfometrik seviyede, apoptotik değişiklikleri ise p53, Bax ve Caspase-3 ekspresyonlarını immünohistokimyasal yöntemle değerlendirerek ortaya koymayı amaçladık. Tüm bunlara ilaveten, oksidan-antioksidan dengenin radyasyona bağlı olarak değişiklik gösterip göstermediğini, shilajit'in bu dengenin korunmasında etkili olup olmadığını da malondialdehit (MDA) ve total antioksidan kapasiteyi biyokimyasal düzeyde analiz ederek aydınlatmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Folikülogenez

Embriyoda 3. hafta sonunda vitellus kesesi duvarında beliren primordial germ hücreleri buradan göç ederek 5. hafta başında gonad taslaklarına ulaşır ve bölünerek oogoniumlara dönüşürler. Sayıları intrauterin yaşamın 5. ayında 7 milyona ulaşır. 3. aydan itibaren 1. mayozun profaz evresine girmeye başlayan oogoniumlar diploten evresinde duraksarlar böylece primer oosit adını alırlar ve yassı folikül hücreleri ile çevrelenerek primordial folikülleri oluştururlar. Gebeliğin 7. ayında oogoniumların çoğu primer oositlere dönüşmüş olsa da primer oositlerin çoğu da atreziye uğrar ve böylece pubertede overler yaklaşık 300,000 oosit içerir (39, 40).

Primordial foliküller ovaryan korteksin en üst katmanında yer alır ve içlerindeki 25µm çaplı oosit, büyük ve ökromatik bir çekirdek, yine büyük bir çekirdekçik içerir ve 1. mayozun profaz evresinin diploten safhasında durur. Maturasyonun germinal vezikül (GV) aşamasında kabul edilen oositler ovulasyona kadar hücre siklusunun G0 olarak adlandırılan dinlenme aşamasında bekler. Bu sürede büyüme ve gelişimleri sırasında mayozun yeniden tamamlanması için nükleer lokalizasyon ve hücre siklus regülatör proteinlerinde belirgin artışlara ve bunu izleyen translasyonel ve post-translasyonel modifikasyonlara gereksinim vardır. Matürasyon olarak adlandırılan bu aşama, hücrenin nükleer ve sitoplazmik bölümlerindeki değişimlerin tümünü kapsar. Oosit ancak bu aşamaları geçtikten sonra fertilizasyona hazır hale gelebilmektedir. Oositin nükleer matürasyonu esnasında mayoz yeniden başlar ve metafaz II'ye geçiş olur. Bu sırada uzun süre folikül içerisinde bekleyen oositler hem mayozu yeniden başlatabilme yeteneği hem de mayotik matürasyonu tamamlamayı sağlayacak protein ve RNA yükünü kazanırlar (40, 41, 42).

Puberte ile birlikte her ay yaklaşık 20 kadar primordial folikül aktive olur ve bunlardan da yalnızca bir tanesi dominant duruma gelir ve primer folikül evresine geçer. Hangi folikülün nasıl seçildiği halen aydınlatılamamıştır (40, 41).

Oosit büyümesinin en hızlı olduğu dönem, foliküler büyümenin birinci evresidir. Bu esnada oositin çapı 125-150 µm'ye kadar ulaşır. Nükleus büyür ve

“germinal vezikül” ismini alır (43). Folikül hücreleri mitozla çoğalır ve tek katlı kübik hücreler ile çevrili unilaminar primer folikül oluşur. Çoğalıp gap junctionlar ile bağlanmış foliküler hücreler granüloza tabakasını oluştururlar ve böylece multilaminar primer folikül (preantral folikül) şekillenir. Bu evrede oositler ile folikül hücreleri arasında zona pellucida (ZP) belirir. Folikül büyüdükçe folikül hücreleri arasında likör folikülü toplanır ve antrum oluşur. Böylece folikül sekonder ya da antral folikül adını alır. Granüloza hücreleri folikül duvarının belli bir bölümünde yoğunlaşırlar. Antrumun içine doğru uzanan ve oositi de içeren bu yapıya kumulus ooforus denir. Bazı granüloza hücreleri ise oositi çevreler ve korona radiatayı oluştururlar. Foliküle komşu stromadaki fibroblastların farklılaşmasıyla steroid hormon sentezleyen hücre özellikleri gösteren teka interna ve onu çevreleyen organize fibroblast tabakasından oluşan teka eksterna oluşur. İki teka tabakası arasındaki sınır belirgin olmamakla birlikte teka interna ve granüloza tabakaları hücresel farkları ve aralarında bazal membran varlığı ile ayırt edilebilir. Her menstrüel döngüde bir folikül baskın hale gelip olgun folikül ya da graaf folikülü (tersiyer folikül)’nü oluştururken diğerleri atreziye uğrar. Graaf folikülü likör folikülü birikiminin bir sonucu olarak son derece büyüktür (yaklaşık 2.5 cm) ve oosit granüloza hücrelerinden oluşan bir sap ile folikül duvarına bağlanır. Granüloza hücreleri folikül büyümesi ile orantılı olarak çoğalmadığı için granüloza tabakası incelik, teka tabakası ise oldukça kalındır (39, 40, 41).

Ovülasyondan hemen önce primer oosit 1. mayoz bölünmesini tamamlar ancak spermatogenezden farklı olarak sitoplazma bölünmesi eşit değildir ve sekonder oosit sitoplazmanın hemen tamamını alırken 1. kutup cismi çok küçüktür ve kısa süre sonra dejenere olur. Büyüyen folikülde üretilen östrojenin kandaki yüksek düzeylerine yanıt olarak ön hipofizden salınan luteinizan hormon (LH) düzeyindeki ani artış ovülasyon için uyarı oluşturur. Ovülasyonda sekonder oosit 2. mayoz girer ancak onun da metafazında takılır. 2. mayoz fertilizasyonla tamamlanır ve 2. kutup cismi oluşur. Ovülasyon sonrası geri kalan teka ve granüloza hücreleri ise korpus luteumu oluşturmak üzere farklılaşır (39).

2.2. İyonizan Radyasyon ve Serbest Radikaller ile İlişkisi

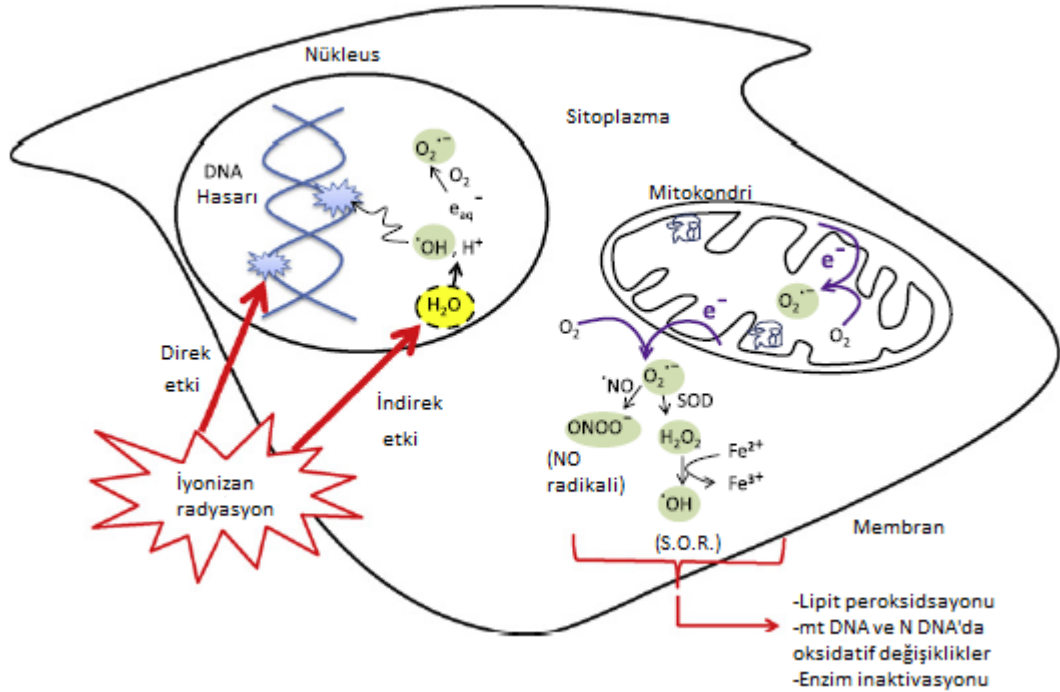
Uzayda bir noktadan diğerine enerji ışımasına radyasyon denmektedir. Radyasyon iyonlaştıran ve iyonlaştırmayan olmak üzere iki etki grubuna ayrılarak incelenmektedir (44). Biz burada çalışmamızın konusuna yönelik olarak yalnızca iyonlaştıran radyasyondan bahsedeceğiz.

İyonizan radyasyonlar, radyoizotopların parçalanması ile oluşan alfa (α), beta (β), gamma (γ) ışınları, nötronlar ve yapay olarak oluşturulan X ışınıdır. Bu radyasyonlar ile iyonizasyon sonucunda hücre içinde ya da çevresinde oluşan primer lezyon pek çok organelin hasarlanması şeklinde gerçekleşir. Radyasyon nedeniyle nükleus ya da sitoplazmada meydana gelen lezyonların bir kısmı tamir edilebilir. Ancak, radyasyon hasarının en önemli sonucu olan kromozom kırılmaları, hücre ölümü ya da genetik değişikliğe neden olmaktadır (44, 45).

Her bir memeli hücresinde her gün 10^4 den fazla Deoksiribonükleik asit (DNA) lezyonu meydana gelir. Lezyonlar spontan bozulma, replikasyon hataları ve hücrel metabolizmadan kaynaklanır. Radyasyon ve kimyasallar gibi çevresel faktörlerse ilave mutajenik yük bindirir (46).

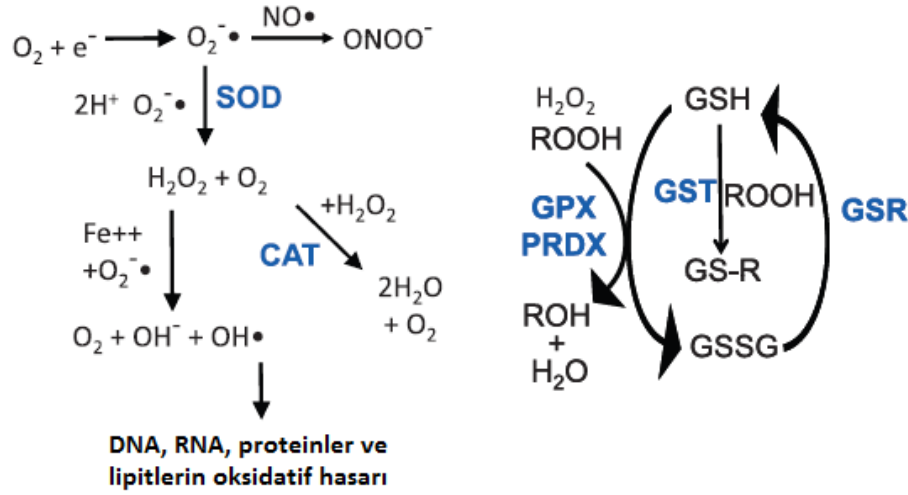
Her ne kadar radyasyonun canlı hücreler üzerindeki biyolojik etkilerini tanımlama eğilimi ağır basıyorsa da gerçekte iyonize radyasyon, tanımı gereği, iyonizasyon adı verilen bir işlem ile atomlar ile etkileşime girer. Bu nedenle radyasyonun bütün biyolojik zararlı etkileri aslında hücreleri oluşturan atomlar ile etkileşimi ile başlar. Sonra moleküller, hücreler, dokular, organlar ve nihayet tüm vücut etkilenir. Bütün bu etki silsilesinin temeli radyasyon ile atomlar arası etkileşime bağlansa da sonuçta radyasyonun hücreleri etkilediği, direkt ve indirekt olmak üzere iki yol vardır (şekil 1). Eğer radyasyon direkt DNA molekülü ya da hücre için yaşamsal bir başka molekülle etkileşime girerse buna direkt etki denir. Dokular %80 oranında su içerdiğinden radyasyonun su molekülü ile etkileşip onu Hidrojen (H), Hidroksil (OH \cdot), Süperoksit (O $_2^-$), Hidroperoksil (HO $_2$), Hidronyum (H $_3$ O $^+$) gibi ürünlere parçalaması daha muhtemeldir. Radyasyon hasarının bu toksik radikaller aracılığı ile oluşmasına da indirekt etki denir ki suyun iyonizasyonu sonucu ortaya çıkan hidroksil radikalleri ve peroksitler radyasyon hasarının %70-80'inden sorumludur. Bu radikaller DNA, proteinler ve lipitler gibi kritik öneme

sahip hücrel bileşenlerle etkileşir ve sonunda oluşan hasar hücrenin ölümüne ya da tümoral oluşumlara yol açar. İyonizan radyasyon aracılı hücre ölümü çoğu durumda apoptoz olarak tanımlanmıştır. (43, 45, 47- 50).



Şekil 1: Radyasyonun direk ve indirek etkisi (SOR, serbest Oksijen radikalleri), (50).

Biyolojik sistemler hücreleri ölümcül oksidatif çevrenin etkilerinden korumak üzere oldukça etkin bir savunma ağına sahiptirler. Bu mekanizmalar $O_2^{\cdot-}$ 'in Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve O_2 'ye dönüşümünü katalizleyen süperoksit dismutaz, hidrojen peroksit ve hidroperoksitleri elimine eden katalaz ve peroksidazlar gibi enzimleri içerir. Sistein içeren bir tripeptid olan glutatyon serbest oksijen radikallerinin (SOR) temizlenmesinde Glutatyon peroksidaz (GPX) 'ın kofaktörü olarak rol alır ve okside (GSH) ve redükte (GSSG) formu arasında gider gelir. NADPH bağımlı bir enzim olan Glutatyon redüktaz (GSR), okside glutatyonu tekrar redükte glutatyonla çevirerek antioksidan mekanizmaya katkı sağlar. Glutatyon S transferaz (GST) 'lar ise reaktif kimyasalları glutatyon ile kovalen olarak bağlayarak toksik maddelerin eliminasyonuna yardımcı olur (Şekil 2) (51, 52).



(SOD, süperoksit dismutaz; CAT, katalaz; GPX, glutatyon peroksidaz; PRDX, peroksiredoksin; GST, glutatyon-S-transferaz; GSR, glutatyon redüktaz),

Şekil 2: Serbest oksijen radikalleri ve antioksidan enzimler (52).

İyonizan radyasyonun indüklediği apoptozun tetikleyicisi serbest radikaller gibi görünmektedir ve antioksidan enzimlerin radyasyonun tetiklediği hücrel ölümüne karşı onları koruma konusundaki önemi daha da artmaktadır (53).

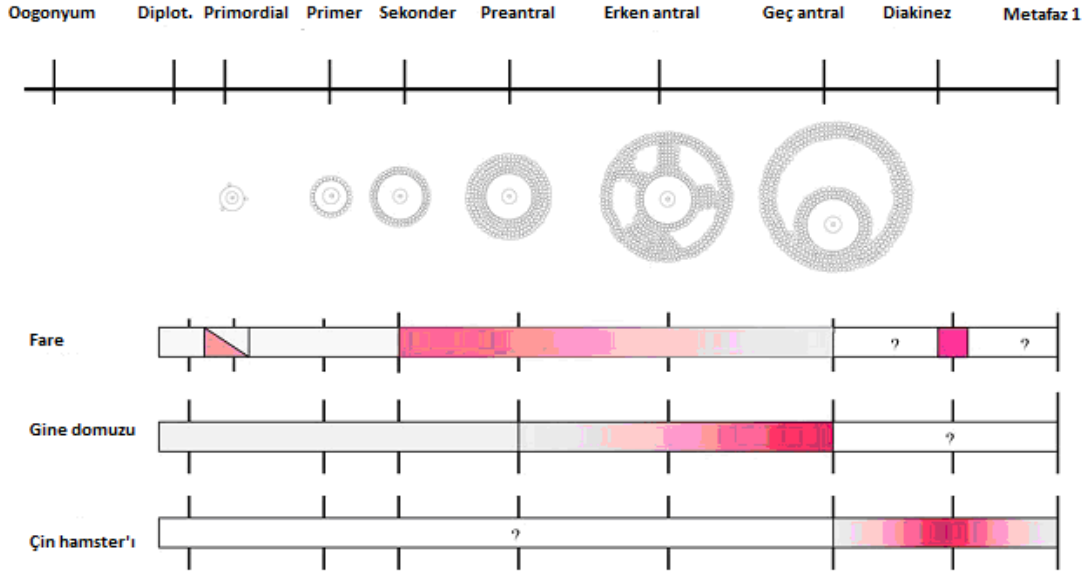
Radyasyon hasarına bağlı oluşan ürünler saldırılan kimyasal bağa, değişime uğrayan baza ve hasarın DNA içinde yayıldığı segmente göre değişir. Işınlamadan sonra ölçülen başlıca hasar ürünleri baz hasarı, baz kayıpları, tek iplik kırılmaları, çift iplik kırılmaları ve DNA-protein çapraz bağlarıdır. Hasarın mahiyetinin belirlenmesinde onarım yeteneği önemlidir ancak tek başına belirleyici değildir. Tek baz hasarı ya da tek iplik kırıkları gibi DNA hasarının basit formları ‘Baz eksizyon onarım işlemi’ (BER) ile kolayca onarılır. Çift iplik kırıkları gibi DNA hasarları hücrel onarım mekanizması için daha zor problemler ortaya çıkarır ve çeşitli onarım yolları, örneğin; Homolog rekombinasyon onarımı ve Non homolog endjoining bu hasarın üstesinden gelmek için evrimleşmiştir. İlkinin DNA’daki küçük hasarları onardığı düşünülmekte buna karşılık non homolog endjoining (Memeli hücrelerinde DNA çift iplik kırıklarının esas mekanizması) muhtemelen DNA sekanslarının değişiklik ve/veya kayıplarına neden olmaktadır. Bundan dolayı DNA çift iplik lezyonlarının kötü onarımının somatik ya da germ hücrelerinde iyonizan radyasyon ile indüklenmiş sabit mutasyonlar için altta yatan temel kritik faktör olduğu düşünülmüştür (54).

2.2.1. Radyasyonun ovaryan foliküller üzerine etkisi

Reproduktif çağ boyunca memeli ovaryan foliküllerinin büyük kısmı atrezi olarak adlandırılan bir bozunma süreci geçirirler. Bununla birlikte atrezinin kesin mekanizması bugün için tam olarak aydınlatılamamıştır (55).

Foliküler atreziyi hızlandıran atretojenik uyarılardan biri de Gamma (γ) radyasyonudur (13). Hem normal hem de tümör dokusu için apoptoz yalnızca spontan olarak gelişen bir süreç olmanın ötesinde radyasyon tarafından da indüklenebilir bir süreçtir (14). Radyasyon apoptozu indükler ve ovaryan fonksiyonları bozar (15).

Bununla birlikte ovaryan radyasyon duyarlılığı hem türler arasında farklıdır hem de bir türün farklı gelişim evrelerindeki ovaryan folikülleri farklı düzeyde radyasyon duyarlılığı gösterir (Şekil 3). Erken foliküler evrelerin yüksek, daha büyük foliküllerin ise düşük duyarlılığı hem sıçanlar hem de fareler için ispatlanmıştır (56).



Radyasyon duyarlılığı renk tonu farkıyla derecelendirilmiştir. (Açık pembe; düşük radyasyon duyarlılığı, koyu pembe; yüksek radyasyon duyarlılığı)

Şekil 3: Fare, Çin hamster'ı ve gine domuzu oositlerinin genetik radyasyon duyarlılığı (folikülogenezle ilişkili olarak) (12).

Radyasyona maruz kalan fare overlerinde foliküler dejenerasyonun granüloza hücrelerinin apoptozisi ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Dejenere olmuş foliküller, piknotik nükleuslu granüloza hücrelerinde artış, hipertrofik teka tabakası ve rüptüre ya da ondüle bazal membran gibi kendilerine has morfolojik karakteristikler gösterirler (57).

2.3. Apoptoz

Literatürde “programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı” olarak da geçen ve grekçe’de yaprakların ağaçlardan düşüşünü nitelemek için kullanılan apoptoz terimi ilk kez Kerr ve ark. tarafından canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu özgün bir hücre ölüm biçimini tanımlamak için kullanılmıştır (58).

Programlı hücre ölümünün özü embriyonun morfolojik gelişim sürecindeki rolü ile yıllardır bilinse de 1972’ye dek bunun bütün hücreler için bir kader olduğu kabul edilmiyordu (58, 59). Bugün ise apoptotik aktivitedeki patolojik artma veya azalmaların kanser, kalp hastalıkları, inme, Akkiz immün yetmezlik sendromu (AIDS), otoimmünite ve dejeneratif hastalıkların ortaya çıkışında rol oynadığı kabul edilmektedir (60).

Apoptozun yoğun olarak çalışıldığı *Caenorhabditis elegans*’da ced-3, ced-4 ve ced-9 olmak üzere apoptoz gelişimi için esansiyel olan üç gen tespit edilmiştir (61, 62) (Tablo 1).

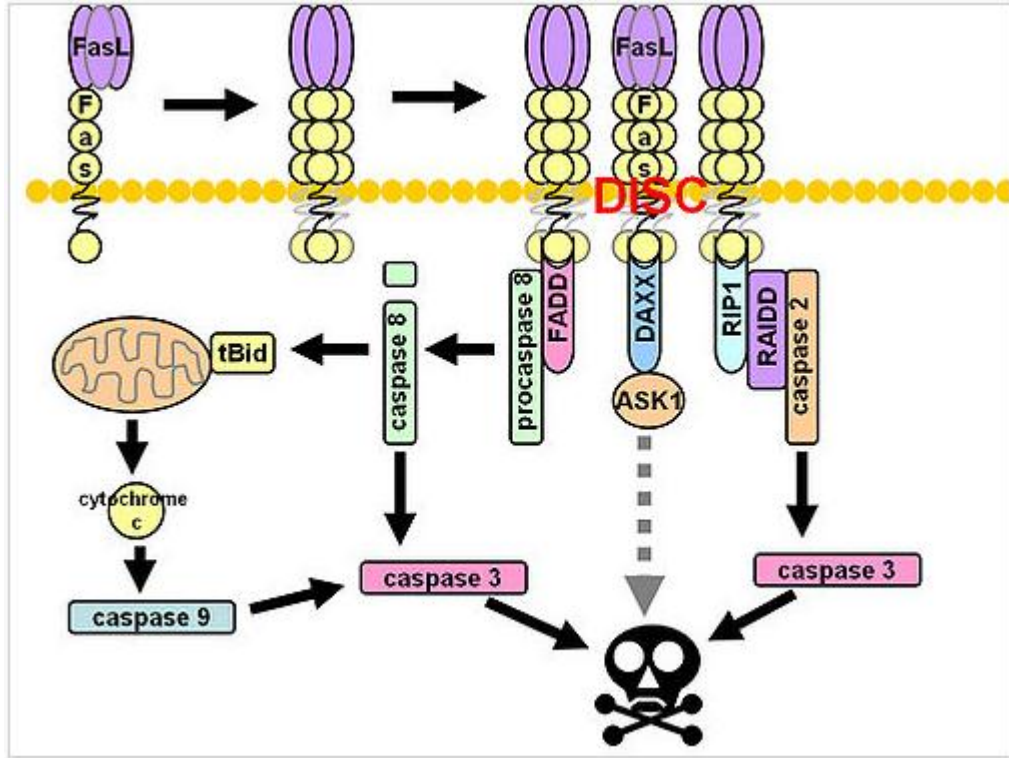
Tablo 1: *C. Elegans*’daki apoptotik genler ve bunların memelilerdeki homologları (61).

Gen adı	Memeli homologu	Aktivitesi
Ced-3	Kaspaz gen ailesi	Proapoptotik
Ced-4	Apaf-1	Proapoptotik
Ced-9	Bcl-2 gen ailesi	Antiapoptotik

Apoptoz başlangıcı doku spesifiktir, yani tüm hücreler aynı stimulusa yanıt olarak elimine edilmezler. Kortikosteroidler timositlerde apoptozu aktive ederken diğer hücrelerde inhibe ederler. Işınlama ve kemoterapötikler sıklıkla p53 aracılı

yolağı tetikler. Bazı hücreler Fas ya da diğer ölüm reseptörlerini eksprese eder ve DISC (Death induced Signaling Complex) oluşturarak bir ölüm sinyali kompleksi meydana getirir (63).

Apoptozun başlatılması ve yürütülmesinde merkezi bir rol oynayan kaspazlar birçok hücrede inaktif proenzimler olarak sentezlenirler ve bir kere aktive olduklarında diğer prokaspazları aktive ederek proteaz zincirinin başlamasını sağlarlar (64). ‘Caspase’ ismi iki enzimatik aktiviteden köken alır. ‘C’ sistein proteaz aktivitesini yansıtırken ‘aspase’ ise aspartik asit ayırma yeteneğini gösterir (65). Kaspazlar 3 domain içeren inaktif proteinler olarak sentezlenirler. Bunlardan ilki aminoterminal domain (prodomain), ikincisi küçük subünit (10 kDa) ve üçüncüsü büyük subünit (20 kDa)’dir. Kaspazlar uzun prodomain’liler (1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13) ve kısa prodomain’liler (3, 6, 7, 14) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Kaspaz 11 septik şoktaki sitokin olgunlaşmasında, kaspaz 12 amiloid β toksitesinde rol alırken kaspaz 14’e embriyonik dokuda rastlanmıştır (66, 67). Uzun prodomain içeren kaspazlar daha çok apoptozun başlangıç kısmında (downstream kaspazların aktivasyonu gibi) etkilidir. Bu yüzden bunlara inisiyatör ya da ‘upstream kaspazlar’ denir. İnisiyatör kaspazlardan 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14 inflamatuvar kaspaz olarak da anılır (68). Kısa prodomainli kaspazlar ise spesifik ölüm substratlarını ayırarak apoptozun daha distal kısımlarında etkili olur [poly(ADP) riboz polimeraz (PARP), ICAD (Inhibitor of caspase activated DNase), gelsolin, lamin]. Bunlar da bu sebeple efektör ya da downstream kaspazlar olarak anılır. İnisiyatör kaspazların çoğunun (8 ve 10 hariç) prodomain’i CARD (Caspase Recruitment Domain) içerir. Kaspaz 8 ve 10 ise DED (Death Enhancer Domain) içerir. Üç boyutlu yapısı aynı olan bu prodomainlerin benzer yapıli moleküller ile bağlanması kaspaz aktivasyonunda temeldir. Bir ligand ölüm reseptörüne bağlandığında bu ilk olarak bir ölüm domain (DD) içeren molekülün bağlanmasını başlatır (ki örneğin Fas reseptörü için bu molekül FADD (Fas associated protein with death domain)’dir. Sonra DED ya da CARD içeren uzun prodomain’in bağlanması ile DISC (Death Induced Signaling Complex) yani ligandın bağlanması ile trimerize olmuş bir ölüm reseptörü+FADD+kaspaz 8) formasyonu oluşur (Şekil 4). Bu da kaspaz 3 gibi efektör kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanır (69).



Şekil 4: Fas reseptörü aracılı apoptozda DISC formasyonu ve kaspaz 3 aktivasyonu (70).

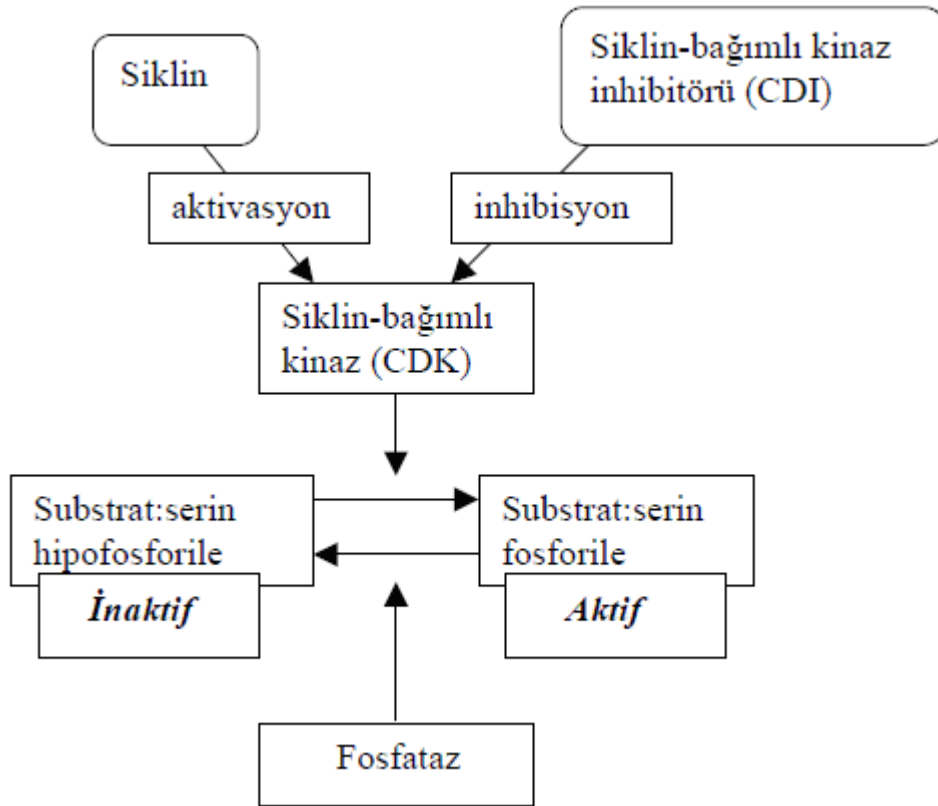
Bcl-2 ailesi üyelerinin hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğinin saptanmasında merkezi bir role sahip oldukları gösterilmiştir. Bu aile üyeleri antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1) ve proapoptotik (Bax, Bak, Bcl-xs, Bad, Bik, Bid, Hrk, Boo, Egl-1) olarak iki gruba ayrılırlar. Bu aile üyelerinin çoğu (Bad, Bid, Egl-1 hariç) mitokondri dış membranında yerleşik bir transmembran domain içerir. Bcl-2 protein ailesinin temel etki mekanizmasının mitokondrial membran geçirgenliğini değiştirerek sitokrom c serbestleşmesinin kontrolü olduğu düşünülmektedir (71, 72).

p53 tümör supresor proteini Bcl-2 protein ailesinin düzenlenmesinde kritik role sahip olmakla birlikte tam mekanizması aydınlatılamamıştır (73). p53 tümör baskılayıcı geni hücre siklusunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür ve insan tümörögenezinde en yaygın mutasyona uğrayan gendir. Apoptoz ve hücre siklusu birbirini ile çok yakın ilişki içindedir. Öyle ki p53 hem apoptozda rol alır hem de siklusu durdurup hücreye DNA hasarlarını onaracak zaman kazandırır (74).

Genel olarak bir bölünme sinyali almayan hücreler hücre siklusunun istirahat yani G0 fazında beklerler. Hücre, büyüme faktörleri, mitojenler, sitokinler gibi

bölünme sinyallerini aldığında sinyal iletim zinciri mekanizması (Map kinaz, Protein kinaz C, JAK/STAT yolları gibi) devreye girer. Bu mekanizma ya transkripsiyonu, hücre siklusunu ya da hücre iskeletini kontrol eden bir substratı fosforiller veya STAT'ta olduğu gibi nükleusa ulaşıp doğrudan transkripsiyonu düzenler. Hücreler mitoz girmeden önce interfaz denen bir hazırlık safhası geçirirler ve bu safhada siklinler gibi bölünme için gerekli çeşitli düzenleyici proteinleri ve DNA gibi makromolekülleri sentezlerler. İnterfaz da G1, S ve G2 fazlarından oluşur. Mitoz ve interfaz birlikte hücre siklusunu oluşturur. Böylece hücre siklusu G1, S, G2, M fazlarında oluşur. G1 ve G2, "Gap" (ara, boşluk) sözcüğünden gelir. S ise DNA sentezini ifade eder. G0 fazı ise hücre siklusu içinde yer almayan, siklusunu tamamlayıp sikludan çıkan hücrelerin bulunduğu fazdır.

Hücre siklusu, siklusa özgü proteinler olan siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından kontrol edilir. CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftir. Ancak sikline bağlandıklarında aktif siklin-siklin bağımlı kinaz kompleksleri meydana gelir. CDK'ların aktif formları da substratlarını fosforilleyerek onları aktif hale getirir (Şekil 5).



Şekil 5: Siklin bağımlı protein kinaz sistemi (75).

Siklinlerin (A, B1, D, E) seviyeleri faza özgü olarak transkripsiyon seviyesinde düzenlenir, yıkımları ise 'ubiquitin' metabolik yoluyla sağlanır. Bu faza özgü yapım ve yıkım siklinlerin etkileştiği CDK'ların (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK25) aktivitelerini düzenler. CDI'leri (p15, p18, p19, p21, p27) ise ya siklinlere, ya CDK'lara, ya da siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe eder. Siklin D başlama siklini olarak çalışır ve CDK4 ve CDK6'yı düzenler. Siklin E, G1/S sınırında sentezlenip S fazında yıkılır ve CDK2'yi düzenler. Siklin A, S fazında sentezlenip anafazda yıkılır ve DNA replikasyonunda direkt rolü olduğu düşünülen bir kompleks oluşturmak üzere CDK2 ile birleşir. Siklin B1, S fazının sonunda sentezlenmeye başlar ve G2/M geçişinde sentezi maksimum olur. Sonuçta anafazda yıkılır. Siklin B, MPF'yi (M-Phase/Maturation promoting Factor) oluşturmak üzere CDK2 ile etkileşir ve siklin B'nin anafazda yıkılmasıyla hücre mitozdan çıkıp G1'e döner (75).

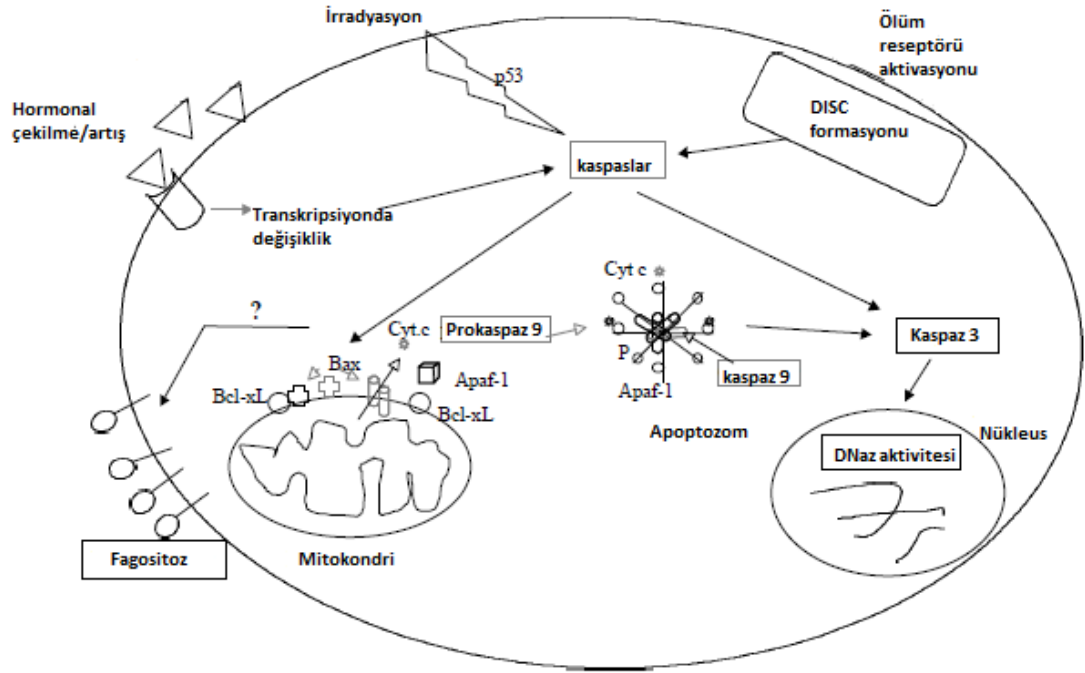
Hücre siklusunda G1-S, G2-M ve Metafaz-Anafaz geçişlerinde siklusun devam edip etmeyeceğine karar verilen kontrol noktaları vardır. Hücre radyasyon ya da toksinlere maruz kaldığında oluşan DNA hasarı nedeniyle bu kontrol noktalarında siklusun G1-S veya G2-M geçişi engellenir (76). Genellikle p53 normal hücrelerde MDM2 (murine double minute 2) proteinine bağlı olarak inaktiftir ve ubiquitin ligazla yıkıldıktan sonra aktifleşir. Radyasyon vb. nedenlerle p53 proteininin MDM2 bağlanma bölgesinin yapısı değişir ve MDM2, p53'ü bağlayamaz. Böylece inaktivasyondan kurtulan p53, p21 ekspresyonunu aktive eder. p21, G1-S (CDK) ve S (CDK) komplekslerine bağlanarak onları inhibe eder ve siklusu durdurarak hücreye onarım için zaman kazandırır ya da Bax genini aktive ederek apoptoza neden olur. Radyasyon ve ilaçlara bağlı DNA hasarı oluştuğunda hücre buna p53'ü arttırarak yanıt verir.

CDK'ların substratlarından biri de G1/S kontrol noktasında siklusu durduran Rb proteindir. Aktif p21, G1 kontrol noktasında Rb proteininin daha fazla fosforlanmasını önler. Hipofosforile Rb, E2F transkripsiyon faktörünü bağlayarak inaktifleştirir. E2F'nin inaktivasyonu ile hücre S fazına geçemez ve siklus durur (77- 79).

Hem Bcl-2, hem de Bax ekspresyonu p53 tarafından düzenlenir (80). p53 bir yandan bax transkripsiyonunu arttırırken diğer yandan bcl-2 ekspresyonunu azaltır (81). p53 ayrıca DNA hasarlandığında DNA onarım proteinlerini aktive edebilir,

hücre siklusunu DNA hasarının tanındığı G1/S düzenleme noktasında durdurabilir ve eğer hasar onarılamayacak ise apoptozu başlatabilir (82). p53 geninin radyasyon, kimyasallar, virüsler (HPV) ile tahrip olduğu ya da Li-fraumeni sendromunda olduğu gibi doğuştan tek fonksiyonel alelinin bulunduğu durumlarda tümörögenез meydana gelir (83, 84). Mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da p53'ün diğer birçok dokuda olduğu gibi granüloza hücrelerinde de apoptozu indüklediği gösterilmiştir (85). Atreziye giden antral foliküllerin granüloza hücre çekirdeklerinde p53 protein akümülyasyonu rapor edilmiştir (86).

Proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri pek çok şekilde aktive edilebilir. Bax transkripsiyonla upregule edilir, Bad sitoplazmadan plazma membranına geçmeden önce fosforillenir, Bid ise mitokondriye geçtikten sonra caspase 8 tarafından bölünür. Antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri mitokondrial membrandaki proapoptotik proteinlerin heterodimerizasyonu ile etki edebilir (69). Agonist ve antagonistlerin birbirlerinin heterodimerizasyonunu ve homodimerizasyonunun her ikisini de gerçekleştirebildiği, bunun da apoptoz inhibisyonu ya da apoptoz ile sonuçlandığı bilinmektedir (87). Örneğin, Bcl-2 ve Bcl-x1, Bax ile heterodimerize olur. Homodimerize Bax mitokondrial membranda porlar açar. Bcl-2 ve Bcl-x1, Bax'ın homodimerizasyonunu inhibe ederek por oluşumunu önleyebilir (88). Porlar sitokrom c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi mitokondrial proteinlerin serbestleşmesini sağlar. Sitokrom c mitokondri iç membranının dış yüzüne bağlıdır ve sitokrom c1'den sitokrom oksidaz'a e^- taşır. Sitokrom c sitoplazmaya serbestleştiğinde prokaspaz 9'u aktive ederek apoptoz indüksiyonuna katılır. Sitokrom c bunu APAF-1 (Apoptosis Activating Factor-1) ile birlikte yapar. Hem prokaspaz 9 hem de APAF-1 CARD domain içerir ve bu sayede birbirlerini çekerler. Bu da prokaspaz 9'un proteolitik yarılmasına neden olur. APAF-1, kaspaz-9 ve sitokrom c'yi içeren bu kompleks Apoptozom olarak bilinir (Şekil 6).



Şekil 6: Apoptozda gerçekleşen olayların özeti (89).

Günümüzde ekstrinsek ya da ölüm reseptörü yolağı ve intrinsek ya da mitokondrial yolak üzere iki temel apoptotik yolak olduğu gösterilmiştir. İlave bir yolak da T hücre aracılı sitotoksite ve perforin-granzim aracılı hücre ölümünü içerir. Bu üç temel yol kaspaz 3 aktivasyonu ile başlayıp DNA fragmentasyonu, sitoskeletal ve nükleer proteinlerin parçalanması, Protein çapraz bağlanmaları, apoptotik cisimlerin oluşumu, fagositik hücre reseptörleri için ligand ekspresyonu ve fagositoz ile sonuçlanan ortak yolda birleşir (90).

Ekstrinsek yolda apoptoz tümör nekroz faktör (TNF) reseptör geni süperailisine üye ölüm reseptörlerini içeren transmembran reseptör aracılı etkileşimlerle başlar (91). TNF reseptör ailesi intraselüler bir DD içerir ve bu DD ölüm sinyalinin hücre içi sinyal mekanizmalarına aktarılmasında önemli rol oynar. Bugün için en iyi karakterize edilmiş olan ölüm reseptörleri ve ligandları FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 and Apo2L/DR5'dir (92, 93). Bunlardan FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 modelleri iyi tanımlanmıştır. Bu modellerde reseptör ligandın bağlanmasıyla trimerize olur bunun üzerine uygun DD gösteren sitoplazmik adaptör proteinler reseptörle bağlanır. Fas ligandın Fas reseptörü ile bağlanması adaptör protein FADD'nin, TNF ligandın TNF reseptörüne bağlanması adaptör protein TRADD'nin bağlanması ile sonuçlanır (94, 95). Bu noktada FADD

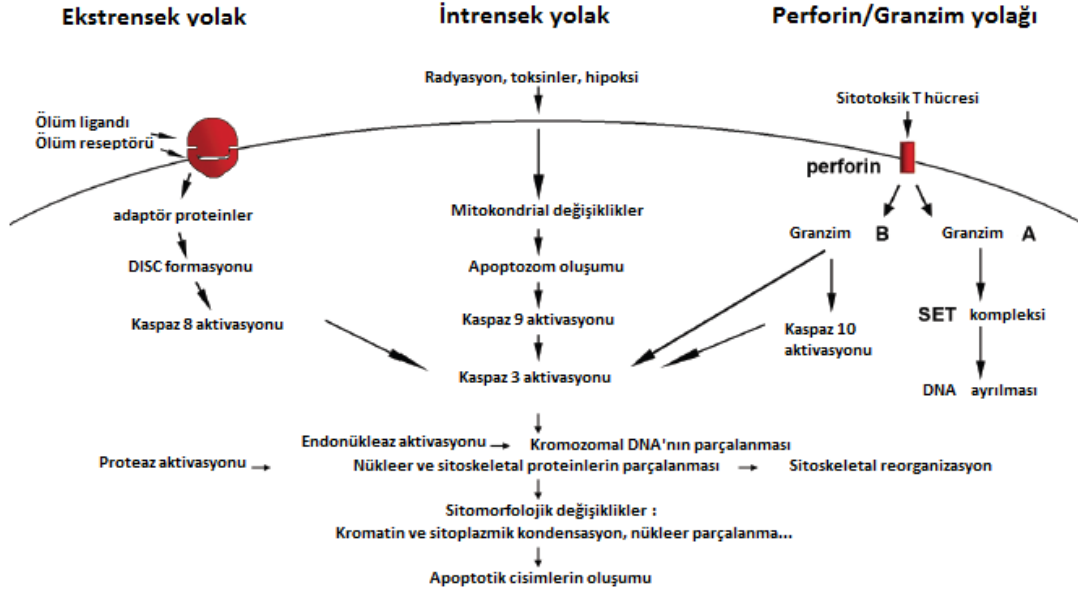
prokaspaz 8 ile etkileşir, DISC formasyonu oluşturur ve böylece prokaspaz 8 aktifleşir ve ortak faz tetiklenir (96).

Sitotoksik T lenfositler hedef hücreleri FasL/FasR etkileşimi ile öldürseler de özellikle tümör hücreleri ve virüsle enfekte hücrelerde transmembran por oluşturan bir molekül olan perforin salınımıyla da etki gösterirler ve böylece birer serin proteaz olan Granzim A ve Granzim B içeren granüllerini hedef hücre içine boşaltırlar (97). Granzim B proteinleri aspartat rezidülerinden parçalayarak prokaspaz 8'i aktifler ve ICAD'ı ayırıp aktifleştirebilir. Yine granzim B'nin mitokondrial yolağı kullandığı ya da kaspaz 3'ü doğrudan aktive edebildiği (ki bu durumda inisiyatör kaspazlar by-pass olur) de gösterilmiştir (98, 99). Granzim A ise DNase'ı inhibe eden bir protein kompleksini (SET (Nucleosome assembly protein)) parçalayarak apoptotik DNA yıkımını başlatır (100).

İntrensek yolağı hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinlerin çekilmesi ile apoptotik supresyonun ortadan kalkması ya da radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral infeksiyonlar ve SOR gibi faktörler başlatır. Bu yolda Bcl-2 ailesi üyeleri mitokondrial membran geçirgenliğini yöneterek proapoptotik ya da antiapoptotik etki gösterirler. Bütün bu uyarılar apoptozom oluşmasına yol açar ve kaspaz 9 aktive olur (101). Yine porlar yoluyla sitozole geçen Smac/DIABLO (Second mitochondrial activator of caspase/direct IAP binding protein with low PI ve HtrA2/Omi (High-temperature requirement), IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins)'ı inhibe ederek apoptozu başlatır. Porlar yoluyla sitozole geçen diğer proteinler, AIF, endonükleaz G ve CAD (Caspase-Activated DNase) da çekirdeğe geçerek DNA fragmentasyonuna neden olur (102- 104)

İntrensek ve ekstrensek yollar ortak yol denen bir yolda birleşirler (Şekil 7). Bu yolda görev alan efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) endonükleazları aktive edip nükleer materyali ve yine proteazları aktive ederek nükleer ve sitoskeletal proteinleri parçalarlar. Substratları sitokeratinler, PARP (Poly ADP ribose polymerase; DNA tamir mekanizmasında rol alan bir enzim), Alfa fodrin (plazmam membranında yer alan bir sitoskeletal protein), NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus Protein)'dır. En önemli efektör kaspaz olan kaspaz 3, kaspaz 8, 9 ya da 10 tarafından aktive edilir. Aktif kaspaz 3, proliferen olan hücrelerde inhibitörü ile birlikte (ICAD (Inhibitor of CAD)) kompleks halinde bulunan CAD (Caspase-Activated DNase)'ı

inhibitöründen ayırarak aktifler (98). CAD da kromozomal DNA'yı parçalar. Kaspaz 3 ayrıca substratları gelsolin ve aktin bağlayıcı protein üzerinden etki ederek sitoskeletal organizasyonunu bozar (105).



Şekil 7: Apoptozdaki yolakların şematik sunumu (106).

Apoptotik hücrenin fagositozu apoptozun son basamağıdır. Fosfolipit asimetrisi ve fosfatidilserin'in hücre yüzeyine çıkışı bu fazın en önemli işaretidir. Böylece apoptotik hücrenin non inflamatuvar fagositik tanınması kolaylaşır ve apoptotik cisimcikler komşu parankimal hücreler ve makrofajlarca fagosite edilir. (107, 108). Overde, teka hücreleri üzerindeki SR-B1 (Scavenger Receptor Class B Type 1) yüzeylerinde fosfatidilserin eksprese etmiş granüloza hücrelerinin tanınmasına ve bağlanmasına aracılık eder (109).

2.3.1. Apoptoz morfolojisi

Apoptozun erken evresinde hücre büzüşmesi ve piknoz ışık mikroskopik olarak gözlemlenebilir. Hücre büzüşmesi ile hücre küçülür, sitoplazma yoğunlaşır, organeller daha sıkı paketlenir. Apoptozun en karakteristik özelliği olan piknoz kromatin kondensasyonunun bir sonucudur (58). H+E boyalı preparatlarda apoptotik hücre yuvarlak ya da oval şekli, koyu eozinofilik sitoplazma ve koyu mor nükleer

kromatin parçaları ile dikkat çeker. Plazma membranında bleb oluşumunu karyoreksis ve hücrenin apoptotik cisimciklere ayrılması izler. Apoptotik cisimcikler sitoplazma ve içerisinde sıkıca paketlenmiş organellerden ibarettir. Nükleer materyal olabilir ya da olmayabilir. Apoptoz inflamatuvar bir reaksiyon oluşturmaz. Çünkü, 1) apoptotik hücreler hücrel içeriklerini çevre hücrelerarası alana bırakmazlar, 2) Çevredeki hücrelerce hızlı bir şekilde fagosite edildiklerinden sekonder nekroz oluşmaz, 3) Apoptotik hücrelerin etrafını sarıp fagosite eden hücreler antiinflamatuvar sitokinler salarlar (110).

2.3.2. Folikül atrezisi ve apoptoz

Fetal overlerdeki foliküllerin sadece çok küçük bir kısmı ovülasyona erişebilir. Çoğu ise hormonal olarak kontrol edilen ve apoptotik bir süreç olan atreziye maruz kalır (111).

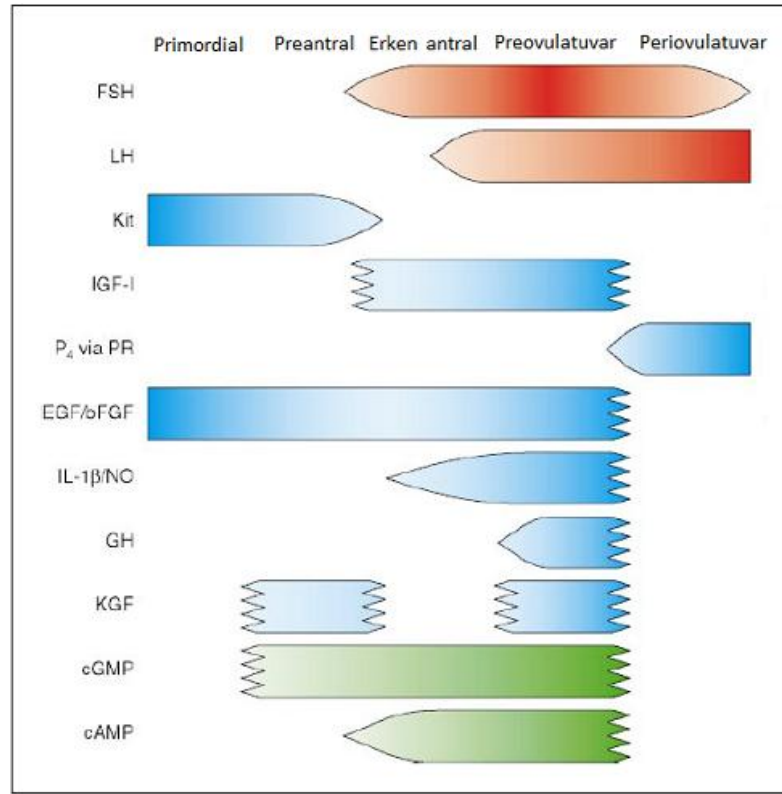
FSH, hem kültür ortamında hem de in vivo folikül devamlılığı açısından çok önemli bir hormondur (112) ve atrezi esnasında granüloza hücrelerindeki folikül stimülan hormon (FSH) reseptörlerinde belirgin bir düşüş mevcuttur (113). Bununla birlikte atretojenik süreç oldukça karmaşıktır, folikül ve oosit devamlılığını sağlayan faktörler ile atretojenik faktörler arasındaki karmaşık denge folikülün kaderini belirler (114) (Tablo 2).

Folikül, gelişiminin herhangi bir aşamasında atreziye uğrayabilir (40). Atretik folikül morfolojik olarak, granüloza hücrelerinde mitozun durması, granüloza hücre çekirdeklerinin piknozu, bazal membranın bozulması (rüptüre ya da ondüle hal alması), hipertrofik teka tabakası, granüloza hücrelerinin bazal laminadan ayrılması, bozulmuş zona pelusida gibi özellikler gösterir (40, 115).

Tablo 2: Foliküler apoptoza etki eden faktörler (116).

Folikül/oosit devamlılığını sağlayan faktörler	Atretojenik faktörler
Gonadotropinler (özellikle FSH)	IGF bağlayıcı proteinler
IGF-1/GH	TGF- β
EGF/TGF- α	IL-6
VIP,KGF,HGF, β FGF	Androjenler
IL1- β ,NO	Reaktif oksijen radikalleri
Östrojenler	GnRH
Serbest radikal çöpçüleri	Bax
Bcl-2, bcl-xl	Fas antijenleri
Kit	p53
GDF-9	ICE-ilişkili proteazlar
cAMP, cGMP	TNF- α
Aktivin	

Folikül atrezisi hormonal olarak kontrol edilen bir süreçtir ve farklı ovaryan folikül gelişim evrelerinde farklı hormonal faktörler bu kontrolde rol oynar (111).



Gonadotropinler (kırmızı), lokal faktörler (mavi), hücre içi mediatörler (yeşil). Tırtıklı uçlar daha erken ya da geç evrelerle ilgili çalışma olmadığını belirtmektedir. (bFGF: basic fibroblast growth factor, EGF: epidermal growth factor, GH: growth hormone, IL-1β: interleukin 1β, P₄: progesterone, PR: progesterone receptor)

Şekil 8: Ovaryan folikül devamlılığını evre bağımlı olarak düzenleyen faktörler (111).

Folikül hücrelerinin devamlılığını sağlayan birçok lokal büyüme faktörü olsa da bu noktada esas düzenleyici gonadotropinlerdir. Folikül antral evreye ulaştığında FSH reseptörleri eksprese eder ve FSH uyarımına bağımlı hale gelir. LH ise ovülasyona yaklaşan ve LH reseptörü eksprese eden foliküller için önemlidir (111). LH pikinin baskılanması sıçan overlerindeki söz konusu foliküllerde masif atreziye sebep olmuştur (115). Folikül büyüme ve yıkımı arasındaki çok hassas dengeyi anlayabilmek için bu foliküller evre bağımlı düzenlemeyi kabul etmek yerinde olacaktır (111).

2.4. Shilajit

Ayurveda, Siddha ve Unani gibi geleneksel tıp sistemlerinde binlerce yıldır kullanılan ve silajit, silaras adrija, girija, asphalt, mineral pitch, momio olarak da bilinen shilajit, soluk kahverenginden kahverengi-siyaha değişen renkte ve değişken yoğunlukta bir sızıntıdır (Şekil 9). Shilajit, Hindistan yarımadasındaki Himalaya sıradağları ve Afganistan (Hindikuş, Badakh-Shan), Avustralya (Northern Pollock Ranges) ve eski Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği (Tien-shan, Pamir, Kafkaslar, Ural)'ndeki diğer dağ sıralarının kayalık tabakalarından, özellikle yaz aylarında kaya sıcaklıkları arttığında sızar ve bu dağ sıralarının 1000-5000 metre yüksekliğindeki dik yamaçlarının kaya yüzeylerinden küçük miktarlarda toplanır. Shilajit kaya köklerinde (Rhizosphere) oluşur ve organik humik maddeler ile bitkisel ve mikrobiyal metabolitlerin kompleks bir karışımıdır (38).

Shilajit'in tam kimyasal yapısını anlamak için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Sonuçta shilajit'in esas olarak Humus (% 60-80) ve bunun yanında benzoik asit, hippurik asit, yağ asitleri, ichthyol, ellagic asit, adipik asit, süksinik asit, sitrik asit, oksalik asit gibi organik asitler, resin, mumlu maddeler, sakız, albuminoidler, triterpenler, sterol, aromatik karboksilik asitler, 3,4 benzokumarinler, dibenzo- α -pironlar, dibenzo- α -piron-kromoproteinler, amino asitler ve fenolik lipitler ve karotenoidler, indigoidler gibi renkli maddeler, esansiyel yağlar ve B1 ve B12 gibi vitaminler ile diğer organik komponentlerden oluştuğu tespit edilmiştir (117- 119). Shilajit'in kompozisyonu, yerleşik bitki türleri, kayanın jeolojik doğası, bölgesel ısı profili, nem ve rakım gibi birçok faktörden etkilenir. Örneğin, Hindistan'ın Kumoan bölgesinden elde edilen shilajit'in, Nepal, Pakistan ve Rusya'dan elde edilen shilajit ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranda fulvik asid içerdiği bulunmuştur (sırasıyla % 21.4, % 15.4, % 15.5, % 19.0). Benzer şekilde farklı ülkelerden elde edilen shilajit'in % 1'lik sulu çözeltilerinin pH'ı da farklıdır, şöyle ki, Hindistan (Kumoan) için 6.2, Nepal (Dolpa) için 7.5, Pakistan (Peshawar) için 6.8 ve Rusya (Tien-Shan) için 8.2. Yine bu ülkelerden elde edilen shilajit'in humik bileşenleri de farklıdır (117).

Shilajit'in esas fizyolojik etkisinin aktif bileşenler için taşıyıcı moleküller olan fulvik ve humik asitle birlikte biyoaktif dibenzo-alfa- piron'ların varlığına bağlı olduğu rapor edilmiştir (120).



Şekil 9: Santimetre ölçeği ile resimlenmiş işlenmiş kaya shilajiti (121).

2.4.1. Shilajit'in geleneksel tıpta kullanımı

Shilajit birçok ülkede geleneksel tıp sistemlerinin bir parçası olarak kullanılmıştır ve birkaçı modern bilimsel değerlendirmeler sonucu da doğrulanmış birçok tedavi edici özellik tespit edilmiştir (122, 123).

Ayurveda Siddha ve Unani tıp gibi geleneksel Hint tıbbi metinlerine göre shilajit dahilen kullanıldığında kuvvet verici, laksatif, ekspektoran, diüretik, immüno-modülatör, litotriptik ve antihipertansif, haricen kullanıldığında ise antiseptik, analjezik ve germisid etki gösterir. Yine bu metinlere göre, splenomegali, epilepsi, sinirsel bozukluklar, kronik bronşit ve anemide de reçetelenebilir ve afrodisyak etkinliği vardır. Ödem, hemoroid, obezite ve anoreksi tedavisinde yararlıdır. Süt ile birlikte verildiğinde diabetes mellitusu tedavi edici etki gösterir. Ayurveda'ya göre shilajit yaşlanmaya neden olan ürünleri bloke eder ve gençleştirici etki gösterir. Commiphora wightii (guggul) ile birlikte verildiğinde kırıkları tedavi eder. Bu durumda kallus formasyonu oluşumunu başlattığına inanılmaktadır. Aynı formülasyon osteoartrit ve spondilit tedavisinde de kullanılmaktadır (117, 120, 123, 124).

İbn-i Sina, El-Kanun fi't-Tıb (Canon Medicinæ) adlı kitabında shilajit'in tümörleri ve sivilceleri yok edici özelliğinden bahsetmiştir (122).

2.4.2. Shilajit'in etkileri üzerine prelinik ve klinik araştırmalar

2.4.2.1. Antioksidan aktivite

Ghosal ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada işlenmiş shilajit'in sülfid anyonları, hidroksi ve nitrik oksit serbest radikallerini nötrale etme yeteneği değerlendirilmiştir. Çalışmada shilajit ile ve shilajitsiz olmak üzere serbest radikallerle kimyasal polimerizasyon ölçülmüştür. İşlenmiş shilajit metil metakrilatı hidroksil radikali ile indüklenen polimerizasyona karşı neredeyse tama yakın korumuş ve metil metakrilatın sülfid serbest radikali ile indüklenen polimerizasyonunu anlamlı oranda inhibe etmiştir. Shilajit, nitrik oksit serbest radikallerini etkin bir şekilde yakalamıştır ve antioksidan etkisi doz bağımlıdır. Daha yüksek konsantrasyonlarda shilajit'in SOR'a karşı koruyucu etkisi de artmaktadır (125).

Farklı bir çalışmada shilajit'in rat karaciğer homojenatlarında lipit peroksidasyonu ve glutatyon içeriği üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Shilajit'in lipit peroksidasyonunu, kümen hidroperoksit ve ADP/Fe⁺⁺ kompleksi oluşumunu doz bağımlı olarak indükleyerek inhibe ettiği bulunmuştur (126).

Rege ve ark. (2012) shilajit'in antioksidan ve anti artritlik özelliklerini değerlendirmek üzere invitro bir çalışma yapmışlardır. Shilajit'in antioksidan özelliklerini, radikal süpürücü, lipit peroksidasyonu önleyici ve redüktif kapasite gibi 3 in vitro parametre ile anti-artritlik aktivitesini de proteinaz inhibitörü etkisi ile araştırmışlardır. Shilajit'in serbest radikal süpürücü etkinliği, kolay ve sık kullanılan bir metod olan stabil 1,1 difenil-2-pikril hidrazil radikalinin rengini mordan sarı ya çevirme yeteneği ile değerlendirildiğinde doz bağımlı olarak askorbik asit benzeri bir radikal süpürücü etki gösterdiği saptanmıştır. Yine shilajit'in MDA düzeylerinde anlamlı bir düşüşe neden olduğu (p<0,05) ve lipit peroksidasyonunu önlediği tespit edilmiştir. Bir bileşiğin redüktif kapasitesi onun antioksidan potansiyelini yansıtır. Bu nedenle shilajit'in redüktif kapasitesi, ekstraktlarında Fe⁺³ ü Fe⁺² ye çevirme yeteneği ile değerlendirilmiş ve shilajit'in artan konstrasyonları ile paralel olarak

artış gösteren bir redüktif kapasiteye sahip olduğu doğrulanmıştır. Son olarak shilajit ekstresinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,05$) ve doz bağımlı olarak proteinaz inhibitörü aktivitesi gösterdiği saptanmıştır ki bu da onun anti-artritik etkisini yansıtmaktadır (127).

Mandlik ve ark. (2008); ise yaptıkları bir çalışmada alloksan ile deneysel olarak diabet oluşturulan sıçanlara 3 gün sonra shilajit'i de içeren polih herbal bir formülasyonu 300 mg/kg ve 600 mg/kg dozda bir kez uygulamışlardır. Deneklerden hazırlanan pankreatik doku homojenatları incelendiğinde diabetik sıçanlarda katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz (GPX) gibi antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı, lipit peroksidasyonunun arttığı, gözlemlenirken 300 mg/kg ve 600 mg/kg dozda verilen shilajit içeren polih herbal formülasyonun CAT ve GPX düzeylerini arttırdığı, lipit peroksidasyonunu da azalttığı görülmüştür (128).

Surapaneni ve ark. (2012) 21 gün boyunca günde 15 dakika yüzmeye zorladıkları ve böylece kronik yorgunluk sendromu oluşturdukları sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, shilajit'in kompleks enzim aktivitelerini stabilize ederek ve mitokondrial membran potansiyelini koruyarak kronik yorgunluk sendromunun indüklediği mitokondrial disfonksiyonu önlediğini göstermişlerdir. Shilajit, kronik yorgunluk sendromu ile indüklenen mitokondrial oksidatif stresi, nitrik oksit (NO) konsantrasyonu, lipit peroksidasyonu, süperoksit dismutaz (SOD) ve CAT aktiviteleri üzerinden geri çevirmiştir. Mitokondrial SOD, NO ve lipit peroksidasyonu ürünleri stres grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artarken shilajit tüm dozlarda bu değişiklikleri anlamlı düzeyde hafifletmiştir. Yine mitokondrial CAT aktivitesi stres grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşüş göstermiş buna karşın shilajit stres ile indüklenen bu değişiklikleri doz bağımlı olarak geri çevirmiştir (129).

Mohamed-I ve ark. (2012) bir çalışmalarında 100 mg/kg ranitidin ve 600 mg/kg shilajit ile 14 gün boyunca oral yoldan tedavi ettikleri sıçanlarda 14. gün etanol ile gastik ülser oluşumunu indüklemişlerdir. Farklı bölgelerden çıkarılan shilajitlerin etanol ile indüklenen gastrik ülser üzerine etkilerini ranitidin ile karşılaştırarak incelemişlerdir. Lipit peroksidasyonunu gösteren tiyobarbitürik asit ürünlerinin (TBARs) tedavili gruplarda tedavisiz ülser grubuna göre anlamlı düzeyde düştüğünü saptamışlardır. Yine tüm tedavili gruplarda doku CAT aktivitesinin

tedavisiz ülser grubuna göre anlamlı artış gösterdiği ve bu artışın özellikle Hindistan ve Al-Jouf shilajitlerinde ranitidin ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu bulunmuştur. Son olarak doku SOD aktivitesi ve glutatyon (GSH) düzeyleri tüm tedavi gruplarında tedavisiz ülser grubuna göre anlamlı artış göstermiş, bu artış Rusya shilajiti haricinde tüm shilajit gruplarında ranitidin ile kıyaslandığında daha yüksek bulunmuştur (130).

Sharma ve ark. (2003) sağlıklı gönüllü insanlardan oluşan 30 kişilik bir grup ile yaptıkları bir çalışmada, deneklere 45 gün boyunca 2 gr/gün oral yoldan shilajit vermişler ve bu süre sonunda denekleri kan lipit profili ve antioksidan göstergeler bakımından incelemişlerdir. Deney sonunda shilajit'in kan lipit profilini olumlu yönde değiştirdiğini ($p<0.001$) göstermişlerdir. Yine shilajit'in kan SOD, vitamin E ve vitamin C düzeylerini anlamlı ölçüde arttırdığını tespit etmişlerdir ($p<0.001$) (131).

Vivek ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada sıçanlarda isoproterenol (ISO) ile indüklenen kardiyoktoksisite üzerine shilajit'in kardiyoprotektif etkisi ve bu etkide shilajit'in antioksidan özelliklerinin yerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada shilajit ile 250 mg/kg ve 500 mg/kg dozlarda oral olarak 91 gün uygulanan ön tedavinin, 85 mg/kg sc. uygulanan isoproterenol ile indüklenen kardiyak nekroz üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Serum glutamat oksalat transaminaz (SGOT), serum glutamat pirüvat transaminaz (SGPT), laktat dehidrojenaz (LDH), ve kreatin kinaz (CK) gibi marker enzimler ve redükte glutatyon (GSH), lipit hidroperoksit (LHP), lipit peroksit (LPO) gibi oksidatif göstergeler hem serum hem de kalp kası homojenatlarında ölçülmüştür. Yalnız isoproterenol uygulanan hayvanlarda anlamlı myokardial nekroz, serum marker enzimlerinde anlamlı artış ve endojen antioksidanlarda anlamlı düşüşler saptanırken shilajit serum marker enzimlerinin ve lipit peroksidasyonunun seviyesini düşürüp redükte glutatyonu arttırarak anlamlı düzeyde kardiyoprotektif etki göstermiştir. ISO ile birlikte 250 mg/kg ve 500 mg/kg shilajit verilen gruplarda serum kardiyak enzim aktiviteleri yalnızca ISO verilen gruptakinden anlamlı derecede düşüş göstermiştir ($p<0,01$). Özellikle 500 mg/kg tedavi uygulanan grupta lipit peroksidasyonu anlamlı derecede azalmış ve redükte glutatyon anlamlı derecede artmıştır ($p<0,01$). Kalpte ISO grubunda marker enzimlerde ve redükte glutatyonunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma varken ($p<0,01$), LHP ve LPO değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görülmüş ($p<0,01$). Buna karşın shilajit ön tedavisi uygulandığında ISO ile

indüklenen tüm bu değişimlerde anlamlı derecede farklılıklar ortaya çıkmıştır ($p<0,01$). Örneğin kalpte marker enzim düzeyleri ve redükte glutasyon anlamlı derecede artış gösterirken lipit peroksidasyonu özellikle de 500 mg/kg tedavi uygulanan grupta anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,01$). Çalışma sonucunda shilajit'in bu kardiyoprotektif etkinliği muhtemelen endojen antioksidanları arttırması buna karşın membran lipit peroksidasyonunu önlemesine bağlanmıştır (132).

Ghosh ve ark. (2010) lipitden zengin diyetle besleyerek hiperlipidemi oluşturdukları sıçanlarda, polih herbal bir formülasyon olan ve hacimce %32 oranında shilajit içeren kumbhajatu'nun antihiperlipidemik ve antioksidan etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla hiperkolesterolemik sıçanlara 6 gün boyunca oral yoldan kumbhajatu 250 mg/kg ve 500 mg/kg dozda verilmiştir. Bu süre sonunda plazma lipit profili ve karaciğer hücre homojenatlarında SOD ve CAT aktiviteleri ile GSH ve MDA formu üzerinden lipit peroksidasyonu düzeyleri ölçülmüştür. Sonuçta bu formülasyonun plazma lipit profilinde anlamlı bir düzelmeye neden olduğu, her iki dozda da CAT, SOD, GSH ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) konsantrasyonlarını arttırdığı bulunmuştur. Diğer taraftan MDA, kolesterol, trigliserit, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) düzeylerinde anlamlı oranda düşüş gözlenmiştir (133).

Biswas ve ark. (2009) 90 gün boyunca günde iki kez 100 mg/kg işlenmiş shilajit verdikleri infertil hastalarda bu süre sonunda semen MDA düzeylerinde anlamlı bir düşüş ortaya koymuşlardır ($p<0.001$) (134).

Saxena ve ark.'nın (2003) shilajit ile yaptıkları klinik bir çalışmada shilajit'in diabetik hastalardaki antioksidan etkinliği ortaya konmuştur. Her iki cinsten 31-70 yaş aralığındaki 61 diabetik hastaya 30 gün boyunca shilajit kürü uygulanmıştır. Shilajit kürü, tedavi öncesindeki yüksek değerler ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde anlamlı ölçüde düşüş sağlamış, CAT değerleri ise yine anlamlı oranda artış göstermiştir (135).

Shilajit'in antioksidan özellikleri dibenzo alfa pironların ve fulvik asidin varlığına bağlanabilir (120, 122). Dibenzo alfa pironların ve dibenzo alfa piron kromoproteinlerin oksidatif stresle indüklenmiş kronik stres üzerine etkisi sıçan beyninin frontal korteksi ve striatumunda saptanmıştır. Bugün için birçok stres ilişkili hastalığın aslında oksidatif stresle ilgili olduğu bilinmektedir. Kronik stresin

kortikal SOD aktivitesini anlamlı oranda arttırdığı, aynı zamanda CAT ve GPX aktivitesini azalttığı ve yine lipid peroksidaz aktivitesinde bir artış meydana getirdiği bulunmuştur. Hem dibenzo alfa pironlar hem de dibenzo alfa piron kromoproteinleri kronik stres ile indüklenen bu karışıklıkları, SOD aktivitesini normale çekerek ve stresin CAT ve GPX üzerindeki etkisini geri çevirerek ve son olarak lipid peroksidaz aktivitesini azaltarak belirgin bir biçimde düzeltmiştir. Uzun yaşam ile antioksidan enzimlerin (SOD, GPX, CAT) yüksek değerleri arasındaki ilişki kanıtlanmıştır. Diğer yandan antioksidan enzimlerdeki düşüş geriatric şikayetler ve yaşlanma ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca bu enzimlerin spesifik beyin bölgelerindeki aktivitelerinin azalmasının Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar için birer etyolojik faktör olabileceği kabul görmüştür (136).

2.4.2.2. Antiülserojenik ve antiinflamatuvar aktivite

Ghosal ve ark. (1988) yaptıkları bir çalışmada shilajit'in karbonhidrat/protein oranını azalttığı ve gastrik ülser insidansını azalttığı ve yine mukus bariyerini arttırdığını bulmuşlardır (137).

Mohamed-I ve ark. (2012) farklı bölgelerin shilajitlerinin etanol ile indüklenen gastrik ülser üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, özellikle Al-Jouf ve Hindistan shilajit örneklerinin ülser skoru ve lezyon alanı gibi parametreleri ranitidinden daha belirgin bir biçimde azalttığını, yine bu iki shilajit türünün etanol'ün indüklediği submukozal ödem ve lökosit infiltrasyonunu önlediğini göstermişlerdir. Yine çalıştıkları shilajit orijinlerinin tümünün sıçanlar üzerinde farklı derecelerde hipolipidemik, antioksidan, antiülser ve etanol ile indüklenmiş ülser üzerine rejeneratif ve onarıcı etkileri olduğunu ve shilajit'in, özellikle de Al-Jouf ve Hindistan shilajit'inin antiülser etkisinin antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antistres, antianksiyete ve rejeneratif etkilerinin bir kombinasyonu yoluyla oluştuğunu raporlamışlardır (130).

Shilajit'in inflamasyonun akut, subakut ve kronik olmak üzere her üç şekli için antiinflamatuvar etki potansiyeli olduğu ortaya konmuştur. Goel ve ark. (1990) deniz yosunlarından elde edilen ve önemli miktarda selüloz içeren bir katkı maddesi (E 407) olan karragenan ile sıçanların arka ayaklarında oluşturulan ödemin

giderilmesinde, 50 mg/kg dozda verilen shilajit'in, fenilbutazon (100 mg/kg i.p.) ve betametazon (0,25 mg/kg i.p.) ile karşılaştırılabilecek düzeyde etkin olduğunu göstermişlerdir (138).

2.4.2.3. İmmünomodülatör aktivite

İsviçre farelerine ilk 5 gün boyunca yalnızca 10 mg/kg, i.p. yolla ve günde iki kez morfin, 6 ile 10. günlerde ise ilgili gruplara morfinle eş zamanlı olarak 0,1 ve 1 mg/kg i.p. yolla shilajit uyguladıkları bir çalışmada Tiwari ve ark. (2001) deney boyunca yalnızca morfin uyguladıkları farelerde deney sonunda morfinin analjezik etkisine karşı tolerans geliştiği buna karşılık eşzamanlı shilajit uygulanan deneklerde tolerans gelişiminin anlamlı ölçüde inhibe edildiğini göstermişlerdir (139). İmmün sistem ile santral sinir sistemi arasında çift yönlü bir etkileşim olduğu hipotezini destekleyen çalışmalar ışığında, şu önemle vurgulanmalıdır ki shilajit'in immünomodülatör özelliği morfinin analjezik etkisine karşı gelişen toleransı önlemede rol oynayabilir (139, 140).

Shilajit'in aktive lenfositlerin litik potansiyelini destekleyici etkisi olduğu ve T hücre aracılı sitotoksite ortaya çıkarabildiği bulunmuştur. Shilajit ile muamele görmüş lenfositlerin krom-51 (Cr-51) ile işaretli tümör hücreleri üzerine litik etki göstermesi buna kanıt olarak gösterilmiştir. Fulvik asitle birlikte az miktarda dibenzo alfa pironlar ve 3,8,-dihidroksidibenzo alfa pironların denek başına 400 µg dozda ve i.p. olarak verildiğinde, Ehrlich asit tümör hücrelerinin proliferasyonunu, ölü hücre sayısını belirgin olarak etkilemeden inhibe etmesi, shilajit bileşenlerinin etkisinin immünoregülasyon yoluyla olduğunu düşündürmektedir (126).

Agarwal ve ark. (2007) farelerde shilajit'in immünomodülatör etkisini plasebo ile karşılaştırarak değerlendirmiş ve bu amaçla shilajit ve plasebo uygulanmasından önce ve uygulama sonrası lökosit aktivitesini gözlemlemişlerdir. Shilajit'in hem doz bağımlı hem de maruziyet zamanı ile doğru orantılı olarak lökosit aktivitesini arttırdığı sonucuna varmışlardır. Shilajit ve bileşenleri tümör geliştirilen hayvanlarda tümör gelişiminin erken ve geç evrelerinde farklı derecelerde fare peritoneal makrofajları ve aktive splenositleri ortaya çıkarmıştır (123). Yine Ghosal (1990) shilajit'in sıçan beynindeki monoamin düzeylerine etkisini değerlendirdiği bir

çalışmada, 5 gün boyunca 25 mg/kg ve 50 mg/kg dozda i.p. yolla verilen shilajit'in sıçan beyin dokusunda 5-hidroksi triptamin ve 5-hidroksi indol asetik asit düzeylerini belirgin şekilde düşürdüğünü buna karşılık dopamin, noradrenalin ve bunların metabolitlerinin düzeylerini arttırdığını göstermiştir. Nörotransmitter düzeylerindeki bu değişiklikler artmış humoral immün aktivitede görülenle benzer bulunmuştur (120).

Shilajit sahip olduğu bağışıklık sistemi güçlendirici özellikleriyle konvansiyonel HIV (human immunodeficiency virus) tedavilerinde de bir tamamlayıcı rol üstlenebilir. Temel bileşenlerinden birinin de işlenmiş shilajit olduğu bir formülasyonla HIV'li hastalarda yapılan klinik çalışmalarda formülasyonun semptomlarda belirgin bir düzelme ortaya çıkardığı ve CD4 ve CD8 hücre sayılarını arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu formülasyonla 6 ay süreyle tedavi edilen 22 hastada CD4 hücre sayısı 259 ± 119 'dan 356 ± 203 'e, CD8 hücre sayısı ise 733 ± 483 'den 984 ± 356 'ya yükselmiştir (123, 141).

2.4.2.4. Antidiabetik aktivite

Bhattacharya ve ark. (1995) tarafından erkek albino sıçanlarda streptozotosin (STZ) ile diabetes mellitus modeli oluşturulmuş olup, deney gruplarından ikisine diabet oluşumundan itibaren 28 gün boyunca 50 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün p.o. shilajit kürü uygulanmış, sonrasında ise hiperglisemi ve adacık hücre SOD aktivitesi ölçümü yapılmıştır. STZ'nin gittikçe artan biçimde hiperglisemi oluşturduğu, benzer şekilde pankreas adacık hücre SOD'ını progresif şekilde baskıladığı gözlemlenmiştir. Buna karşılık shilajit normal sıçanlarda 50 mg/kg ve 100 mg/kg p.o. dozlarda kan glukoz düzeyine etki etmezken, STZ'ye bağlı hiperglisemiyi 14. günden itibaren ve özellikle yüksek dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azaltmıştır. Benzer şekilde shilajit hem 50 mg/kg hem de 100 mg/kg p.o. dozlarda, STZ ile oluşan SOD aktivitesindeki düşüşü özellikle de 14. günden sonra geri çevirmiştir ve yine burada da düşük dozlardaki etki anlamsız bulunmuştur. Sonuç olarak shilajit'in STZ'nin yol açtığı hem serbest radikal birikimini hem de beta hücre hasarını önleyebildiği ortaya konmuştur (142).

Trivedi ve ark. (2004) albino sıçanlarda alloksan ile diabet oluşturmuş ve 4 hafta boyunca bu diabetik sıçanları shilajit'in 50 mg/kg/gün, 100 mg/kg/gün ve 200 mg/kg/gün dozu ile ve oral yoldan tedavi etmişlerdir. 100 mg/kg shilajit uygulanan normal kan şekeri kontrol grubunda 2. haftadan itibaren kan glukozu anlamlı oranda düşüş gösterirken yine total kolesterol ve trigliserid düzeylerinde anlamlı azalma ve HDL düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiştir. Shilajit ile tedavi edilen diabetik sıçanlarda tüm shilajit dozlarında kan glukoz düzeylerinde anlamlı düşüş gözlenmiş, maksimum düşüş ise 100 mg/kg dozda görülmüştür. Benzer tablo total kolesterol ve trigliserid düzeyleri için de saptanmıştır. Yine tüm dozlarda HDL düzeyleri anlamlı artış göstermekle birlikte 100 mg/kg tedavi grubu maksimum artış sergilemiştir. 100 mg/kg shilajit, glibenklamid ve metformin gibi antidiabetikler ile kombine edildiğinde onların hem hipoglisemik hem de lipit profili üzerindeki olumlu etkilerini potansiyalize etmiştir (143).

Mandlik ve ark. (2008) shilajit içeren polih herbal formülasyon (DRF/AY/5001) ile sıçan ve fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, özellikle 600 mg/kg dozda formülasyonun hipoglisemik etkisinin 4 mg/kg glibenklamid ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğunu, glukoz tolerans testinde 150 mg/kg, 300 mg/kg ve 600 mg/kg DRF/AY/5001 ve 4 mg/kg glibenklamid'in plazma glukozunu kontrol grubuna göre anlamlı oranda düşürdüğünü ve bu etkinin özellikle 300 mg/kg DRF/AY/5001 dozunda maksimum olduğunu saptamışlardır. Epinefrin ile indüklenen hiperglisemi üzerine 300 mg/kg ve 600 mg/kg DRF/AY/5001'in ve mutad doz glibenklamid'in anlamlı inhibitör etkisinin olduğunu, alloksan ile indüklenen diabette 600 mg/kg dozda DRF/AY/5001'in kan glukozunu anlamlı oranda azalttığını göstermişlerdir. Yine formülasyonun uzun dönem tedavide, langerhans hücrelerinde alloksan ile indüklenen histolojik değişiklikleri hafiflettiği özellikle 600 mg/kg doz grubunda, Alloksan'a bağlı olarak Langerhans adacıklarında gözlenen fibrotik ve nekrotik değişiklikleri tümüyle ortadan kaldırdığını gözlemişlerdir (128).

2.4.2.5. Antialerjik aktivite

Shilajit ve onun temel aktif bileşenleri fulvik asit, 4-metoksi-6-karbometoksibifenil ve 3,8-dihidroksi-dibenzo-alfa-piron'un zararlı uyarılara karşı mast hücre degranülasyonu ve parçalanması üzerine etkileri çalışılmıştır. Shilajit ve aktif bileşenleri duyarlı mast hücrelerinin antijenle indüklenmiş degranülasyonunu anlamlı ölçüde azaltmış, duyarlanmış gine domuzu ileumunun antijenle tetiklenen spazmını belirgin biçimde inhibe etmiş ve mast hücre parçalanmasını önlemiştir (144).

2.4.2.6. Öğrenme, hafıza ve anksiete üzerine etkiler

Dinesh ve ark. (2012) sıçanlarda deneysel olarak oluşturdukları anksiyete ile ortaya çıkan davranış kalıbı üzerine shilajit'in olumlu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Yüzme stresi ile oluşan anksiyetenin neden olduğu immobilitate periyodu artışı, 21 günlük shilajit tedavisi ile (25, 50 ve 100 mg/kg dozlarda) özellikle 14 ve 21. günlerde anlamlı düşüş göstermiştir. Yine oluşturulan anksiyete ile kısalan tırmanma periyodları 21. günde ve tüm dozlarda anlamlı artış göstermiştir (129).

Shilajit'in öğrenme ve hafızayı arttırıcı bir ajan olarak geçerliliği albino sıçanlarda çalışılmış ve işlenmiş shilajit ve aktif bileşenleri (toplam etil asetat ve fulvik asit)'nin öğrenme yeteneği ve hafızayı belirgin biçimde arttırdığı saptanmıştır. Biyokimyasal çalışmalar; kısa süreli shilajit tedavisinin sıçan beynindeki monoamin ve monoamin metabolitleri düzeylerini anlamlı ölçüde etkilemediğini göstermiştir. Fakat 5 günden uzun süren shilajit tedavisinin sıçan beyinde 5-hidroksi-indol-asetik asit konsantrasyonunu azalttığı buna karşılık dopamin, homovalinik asit ve 3,4-dihidroksifenil asetik asit konsantrasyonlarını arttırdığı ve noradrenalin ve 3-metoksi-4-hidrofeniletillen glikol düzeylerini değiştirmedeği gösterilmiştir. Çalışmalar shilajit'in hafıza fonksiyonunu arttırıcı ve anksiyolitik etkilerinin 5-hidroksitriptamin çevrimindeki azalma ve dopaminerjik aktivitedeki artışa bağlı olduğunu ortaya koymuştur (145, 146).

2.4.2.7. Spermatojenik ve oojenik etki

Park ve ark. (2006) shilajit'in fertilite artırıcı bir ajan olarak kullanılabilirliğini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada, 7 haftalık dişi ve erkek sıçanlara 6 hafta boyunca oral yolla, distile su içerisinde çözdükleri shilajitten 2 mg/kg hacim ve sırasıyla 25 mg/kg/gün, 50 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün dozda kür uygulamışlardır. Sonuçta shilajit'in spermatogenezde doz bağımlı olarak bir artış oluşturduğunu buna karşılık testis dokusunda histopatolojik herhangi bir değişiklik meydana getirmediğini göstermişlerdir. Yine dişi sıçanlarda shilajit'in oosit çoğalma ve farklılaşmasını başlattığı, diöstrusu belirgin biçimde kısaltarak ovülasyon frekansını arttırdığı saptanmıştır (147).

Yine Biswas ve ark. (2009) oligospermik hastalarda işlenmiş shilajit'in spermatojenik aktivitesini değerlendirmişlerdir. Bu amaçla semende 20 milyon/1 ml altında sperm sayısına sahip 35 infertil erkek çalışmaya dahil edilmiş ve hastalara 100 mg'lık işlenmiş shilajit tabletlerinden 90 gün boyunca günde iki kez verilmiştir. Semenogram değerlendirmesinde total sperm sayısının anlamlı düzeyde arttığı (% 61.4) ($p<0.001$), iltihabi ve epitelyal hücrelerin anlamlı derecede azaldığı (sırasıyla %55.5 ve %81.1) ($p<0.001$), sperm motilitesinin arttığı ($p<0.001$), normal sperm yüzdesinin 90 gün sonunda % 18.9 arttığı ($p<0.001$) gözlenmiştir. Spermatogenez açısından çok önemli olan testesteron, LH, FSH gibi biyokimyasal belirteçler değerlendirildiğinde serum testesteron ve FSH değerlerinin anlamlı artış gösterdiği (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.05$), serum LH değerinde ise anlamlı bir değişim olmadığı gözlenmiştir (134).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi (BEÜ) Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, BEÜ Fizyoloji Anabilim Dalı, BEÜ Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı ve BEÜ Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nin katılımları ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma için BEÜ Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 13.12.2012 tarihinde 2012-20-00-33 numaralı etik kurulu onayı alınmıştır.

Çalışmamızda, BEÜ Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde üretilen, 6 haftalık, ağırlıkları 80 ile 100 gr arasında değişen 40 adet östrusa erişmemiş (prepubertal) Wistar albino dişi sıçan kullanıldı. Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip deneklerden, vücut ağırlıkları birbirine yakın olanlar aynı grupta olacak şekilde; biri kontrol üçü deney grubu olmak üzere toplam 4 grup, Tablo 3'de gösterildiği gibi oluşturuldu. Tüm denekler, deney süresi boyunca uygun laboratuvar koşulları ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) altında, günlük içme suyu ve % 21 ham protein içeren pelet yemle beslendi.

Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu;

I. Grup (n=10): Işınlama ortamına götürülen ancak ışın uygulanmayan, deney süresince gün aşırı, oral yoldan distile su uygulanan, kontrol grubu.

II. Grup (n=10): Işınlama ortamına götürülen ancak ışın uygulanmayan, deney süresince gün aşırı, oral yoldan 100 mg/kg shilajit uygulanan, shilajit grubu.

III. Grup (n=10): 8.3 Gy tek doz tüm vücut X ışını alan ve ışınlamadan sonra 4. günde sakrifiye edilen, gün aşırı, oral yoldan da distile su uygulanan, radyasyon grubu.

IV. Grup (n=10): 8.3 Gy tek doz tüm vücut X ışını alan ve ışınlamadan 10 gün önce başlayıp ışınlamadan sonra 4. günde yapılan sakrifikasyona kadar gün aşırı oral yoldan 100 mg/kg shilajit uygulanan, radyasyon+shilajit grubu (Tablo 3).

Tablo 3: Deney grupları ve yapılan işlemler.

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Radyasyon	-	-	8.3 Gy (Tüm vücut)	8.3 Gy (Tüm vücut)
Shilajit	-	100 mg/kg, 2 ml/kg hacimde (Oral)	-	100 mg/kg, 2 ml/kg hacimde (Oral)
Distile su	2 ml/kg hacimde (Oral)	-	2 ml/kg hacimde (Oral)	-

Deney süresi boyunca deneklerin ağırlık takibi yapılmış olup, deney sonunda toplam vücut ağırlıkları ile ovaryum ağırlıkları ölçülmüş, her bir grup için ortalama vücut ağırlığı ve ovaryum ağırlığı mg/100 g vücut ağırlığı olarak hesaplanmıştır.

Deneyin 10. gününde radyasyon hasarı oluşturmak amacıyla BEÜ Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda, kontrol grubu ve shilajit grubu hariç diğer gruplardaki her bir denek, intraperitoneal (i.p.) yoldan 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye), 90 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı/Türkiye) ile anestezi yapıldıktan sonra supin (sırt üstü) pozisyonunda sabitlendi. Gerekli doz hesaplaması yapılarak, linear akseleratör cihazı ile tek fraksiyonda tüm vücuda toplam 8.3 Gy X ışını uygulandı.

3.1. Işık Mikroskopik İncelemeler

Dokuların ışık mikroskopik inceleme için işlemlendirilmeleri BEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Rutin Histoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi. Anestezi altında sakrifiye edilen deneklerden çıkarılan ovaryumlar, % 10'luk nötral formalin ile 24 saat tespit edildikten sonra, akar çeşme suyunda yıkama işlemine alındı. Dokular dehidratasyon için, 1 gün süre ile % 70'lik alkolde ve ardından artan alkol serilerinde (%70, 90, 96, 100) birer saat tutuldu. Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma ve optimum inklüzyon için dokular 15'er dk süre ile ksilol ile muamele edildi. Gömme işleminden önce dokular yumuşak parafinde 55 °C'de 1 gece bekletildi. Ardından ovaryum dokuları, Bio Optica marka parafin dispenser ile bloklandı. Hazırlanan parafin bloklardan,

Shandon Finesse 325 marka rotary mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında bloğun tamamı bitene kadar seri kesitler alındı. Tüm kesitler arasında 1/25 oranında örnekleme yapılarak gruplardaki her bir denek için sağlıklı ve atretik folikül sayılarının değerlendirilmesinde kullanılacak kesitler belirlendi. Bu kesitler ovaryum dokusunun genel özelliklerini ortaya koyabilmek için Hematoksilen+Eozin (H+E) ve hasarlanmış folikül morfolojisini daha ayrıntılı gözleyebilmek amacıyla da Periyodik asit schiff+Hemalen (PAS+HL) boyaları ile boyandı. Tüm inceleme ve bulguların fotoğraflandırılmasında, Zeiss AX10 marka foto-mikroskop cihazı kullanıldı. Tüm gruplara ait ovaryum kesitlerinin ışık mikroskopik olarak incelenmesinde follikül sınıflaması, Tablo 4'de belirtilen kriterlere uygun olarak yapıldı.

Tablo 4: Ovaryan foliküllerin sınıflandırılmasında kullanılan kriterler (148).

Folikül	Morfolojik Özellikleri
Primordiyal Folikül	<i>ZP'sı olmayan oositler etrafında tek tabaka yassı, granüloza progenitör hücrelerine sahip follikül.</i>
Primer Folikül	<i>Oositler etrafında bir ya da birden çok tabaka kübik granüloza hücreleri bulunan follikül.</i>
Sekonder (Antral) Folikül	<i>Oositler etrafında iki ya da daha fazla sayıda granüloza hücre tabakasının bulunduğu ve bu hücreler arasındaki boşluklarda folikül sıvısı birikiminin başladığı follikül.</i>
Tersiyer (Graaf) Folikül	<i>Sayısı azalmış granüloza hücrelerinin çevrelediği, folikül sıvısı ile dolu büyük bir antruma sahip, oositin ise kumulus hücreleri denen granüloza hücreleri ile çevrelendiği follikül.</i>

3.2. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

Anestezi altında sakrifiye edilen deneklerden çıkarılan doku örnekleri % 10'luk nötral formalin ile fikse edilerek rutin doku takip prosedürleri uygulanarak bloklandı. Hazırlanan parafin bloklardan Shandon Finesse 325 marka rotary mikrotom kullanılarak 5 mikron (µ) kalınlığında kesitler alındı ve bu kesitlere anti-caspase 3 (aktif), p53 ve Bax aktivitesini araştırmak amacıyla immünohistokimyasal ABC (Avidin-Biotin Kompleks) yöntemi uygulandı. Alınan kesitler ilk olarak deparafinizasyon işlemi için, 55 °C'de 1 gün, ardından 61 °C'de 1 saat inkübe edilip sırasıyla ksilen ve alkol serilerinden geçirilerek suya indirildi. Dokuda formaldehit

fiksasyonundan kaynaklanan reseptör maskelenmesini önlemek için sitrat tamponuna alınan kesitlere mikrodalga fırında yüksek ısı uygulandı. Antijenik determinant bölgelerinin açığa çıkarılmasından sonra kesitler sitrat solüsyonundan distile suya alınıp 20 dk oda sıcaklığında tutuldu. Daha sonra kesitler PBS içerisinde 3 defa çalkalandıktan sonra, endojen peroksidaz aktivitesini önlemek amacıyla 15 dk süreyle %3'lük hidrojen peroksit ile muamele edildi. Nonspesifik bağlanmayı önlemek amacıyla yapılan 5 dk'lık Ultra V block (LabVision, TA-015-UB) uygulamasını takiben 1/100 dilüsyonlarda hazırlanan anti-p53 (Abcam, Rabbit polyclonal IgG), anti-caspase 3 (aktif), (Millipore, rabbit monoclonal IgG) ve anti-Bax (Millipore, Rabbit anti-mouse Bax polyclonal Ab) primer antikörleri kesitlere nemli bir ortamda 1 saat oda ısısında uygulandı. Primer antikör aşamasından sonra, kesitler PBS' e alınıp, uygun sekonder antikör (Biotinylated Link, Dako, K0609) ile 30 dk muamele edildi. Ardından tekrar PBS'e alınan kesitlere 10 dk Streptavidin peroksidaz (Streptavidin HRP, Dako, K0609) kompleksi uygulandı. Süre bitiminde PBS'e alınan kesitlere immün reaksiyon gerçekleşinceye kadar (mikroskop altında) diaminobenzidine (DAB) kromojen solüsyonu (Vector, SK-4100) uygulandı, zıt boyama Mayer's hematoksilen ile yapıldı. Son olarak, kesitler alkol serilerinden geçirilip, ksilen ile muamale edildikten sonra entellan ile kapatıldı. Hazırlanan tüm preparatlar Zeiss marka Axiolab A1 araştırma mikroskobu altında değerlendirilerek bulgularımız fotoğraflandırıldı.

3.3. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Analizi

3.3.1. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA) miktarı, lipit peroksidasyonun göstergesi olarak belirtilmektedir (149). Toplanan serumlar -80 derecede saklandı. Çalışma öncesi serum örneklerinin buz içinde çözünmesi beklendi. Örnekler uniform görünüm alana kadar karıştırıldı. Ardından örneklerden 50 µl alınarak hazır ticari MDA ELISA kitlelerine (Cloud-Clone Corp. Malondialdehyde (MDA) ELISA Kit, Catalog No. CEA597Ge 96tests) ekilerek ölçümler yapıldı. Kitler Robonik marka (Robonik

Readwell Touch, Automatic ELISA Plate Analyser, Mumbai, India) mikropalak okuyucuda 450 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar ng/ml olarak hesaplandı.

3.3.2. Total antioksidan kapasite (TAK)

Toplanan serumlar -80 derecede saklandı. Çalışma ncesi serum rnekerin buz içinde çözünmesi beklendi. rneker uniform görünüm alana kadar karıştırıldı. rnekerin total antioksidan düzeyi, Erel ve ark tarafından geliştirilen Rel Assay marka ticari kit (Rel Assay Diagnostics, Mega Tıp San. ve Tic Ltd şti, Türkiye) kullanılarak Shimadzu UVmini-1240 UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu Scientific Instruments 7102 Riverwood Drive, Columbia, U.S.A) marka spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda okundu (150). Sonuçlar mmol/L olarak hesaplandı.

3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. Dört grubun karışlaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis varyans analizinde alt grupların ikişerli karışlaştırılması ise Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile yapıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

4.1.1. Kontrol grubuna ait ışık mikroskopik bulgular

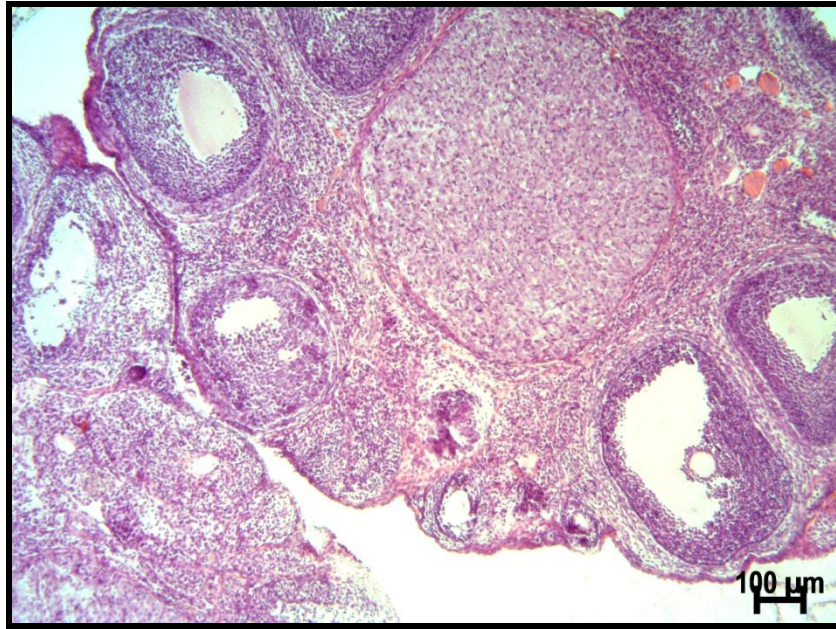
Kontrol grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde ovaryan korteksi en dışta tek katlı kübik epitel hücrelerinin oluşturduğu germinal epitelin döşediği gözlendi. Germinal epitel altında bulunan ve yoğun bağ doku özelliklerine sahip tunica albuginea tabakası süreklilik arz etmekteydi. Bu tabakanın hemen altında ise gelişimin her aşamasında ve kortekse dağılmış foliküller gözlendi. Henüz ZP içermeyen oositleri çevreleyen, tek tabakalı ve genellikle 4-6 yassı granüloza progenitör hücrelerine sahip primordiyal folliküller ovaryan kortekste gruplar halinde bulunmaktaydı. Bu sağlıklı primordiyal foliküller kontrol grubu ovaryumlarında en çok bulunan folikül grubuydu. Belirgin bir çekirdeğe sahip oosit, onu çevreleyen ZP ve aralarında boşluk gözlenmeyen granüloza hücreleri'nden oluşan tek ve çok tabakalı olacak şekilde iki farklı görünümdeki primer folliküller ayırt edilebilmekteydi. Bazılarında Call-Exner cisimcikleri şeklinde ancak genellikle büyük ve geniş bir antrum boşluğuna sahip antral folliküllerdeki kumulus ooforus denilen; primer oosit, ZP ve ZP'yi çevreleyen corona radiata'yı kapsayan granüloza hücreleri açık bir şekilde gözlendi (Şekil 10-14).

Özellikle çok tabakalı primer foliküllerden itibaren, granüloza hücre tabakası ile stroma arasında, bağ dokusunun farklılaşması ile oluşan teka follikülü ayırt edildi. Teka tabakasının folliküle yakın kısmı hücresel karakterde olup teka interna, dıştaki tabaka ise stromayla birleşmiş halde bulunan teka eksterna şeklinde farklılaşmıştı. Avasküler karakterdeki follikülün beslenmesini sağlayan kan damarları teka tabakasında görüldü.

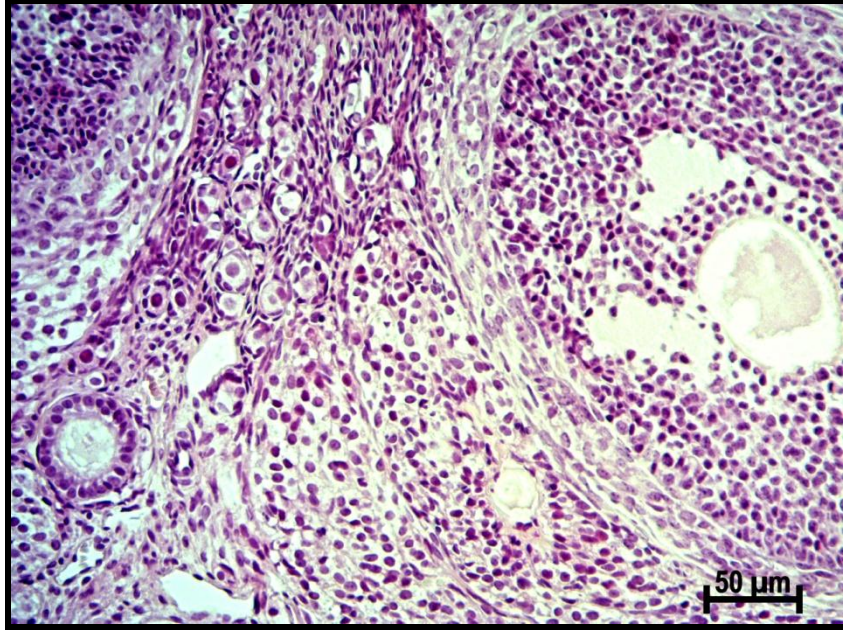
Kesitlerde foliküllerin yanısıra çok sayıda corpus luteum yapısı da izlendi. Foliküller ve corpus luteumlar bağ doku karakterindeki stroma ile çevrelenmişti. Büyük çaplı atretik foliküllere ait teka hücreleri farklılaşarak merkezi yerleşimli büyük çekirdekleri olan, polihedral görünümlü hücrelerden oluşan interstisyel bezleri oluşturmuştu.

Kortekste ayrıca fizyolojik süreç çerçevesinde atreziye uğrayarak elemine edilen dejenere olmuş atretik folliküller görüldü. Bu folliküller, granüloza hücrelerindeki piknotik çekirdeklerin varlığı ile kolaylıkla tanınabilmekteydi. Yine bu foliküllerde, oosit fragmantasyonu, granüloza hücreleri arasındaki hücrelerarası bağlantıların bozulduğunu gösteren granüloza hücrelerinin birbirinden ayrılması ve granüloza hücre tabakaları arasında çok sayıda piknotik çekirdek gözlemlendi.

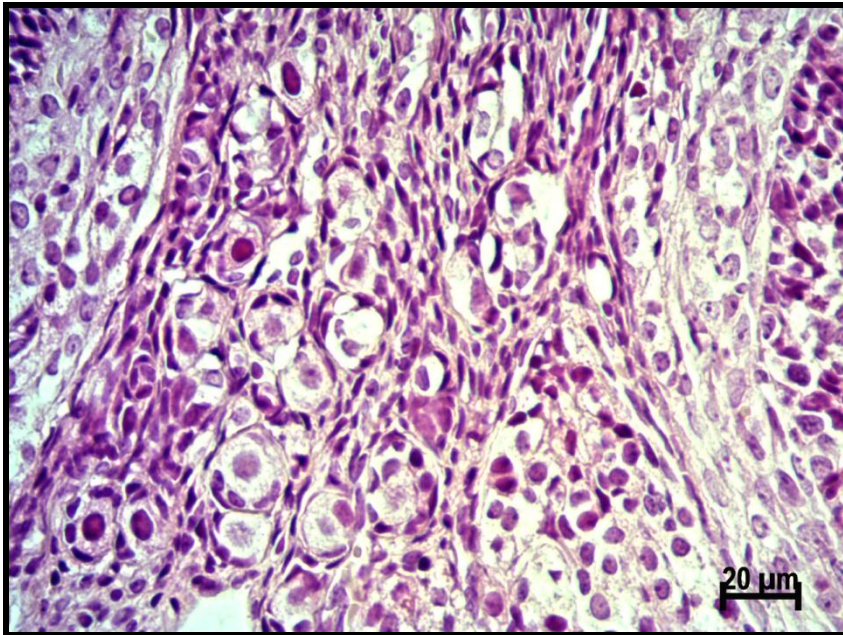
Kontrol grubu kesitlerine uygulanan PAS- HL boyaması ile de farklı aşamalarda sağlıklı folliküller gözlemlendi. Gelişmekte olan folliküllerin PAS (+) boyanan ZP ve bazal membranı net bir şekilde ayırt edildi (Şekil 30).



Şekil 10: Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması. Farklı gelişim evrelerindeki normal görümlü foliküller, bir korpus luteum ve fizyolojik sürecin bir parçası olarak az sayıda atretik folikül gözlenmekte.



Şekil 11: Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması. Ovaryan kortekste normal görümlü çok sayıda primordial folikülle beraber bunların yakın komşuluğunda normal görümlü primer ve sekonder folikül gözlenmekte.



Şekil 12: Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması. Tek katlı yassı granüloza progenitör hücreleri ile çevrelenmiş ve oosit çekirdekleri normal görünümde çok sayıda primordial folikül izlenmekte.



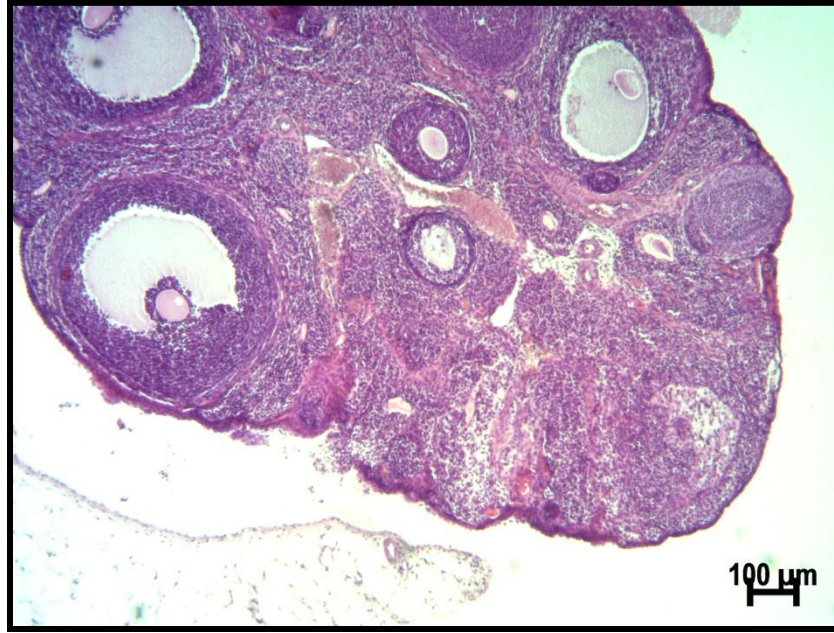
Şekil 13: Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması. Tek katlı yassı ve yer yer kübik görünümlü germinal epitel ile onun altında sıkı bağ doku karakterindeki tunica albuginea gözlenmekte. Normal görünümlü bir primordial ve primer folikül ile interstisyel bezler hemen tunica albuginea altına yerleşmiştir.



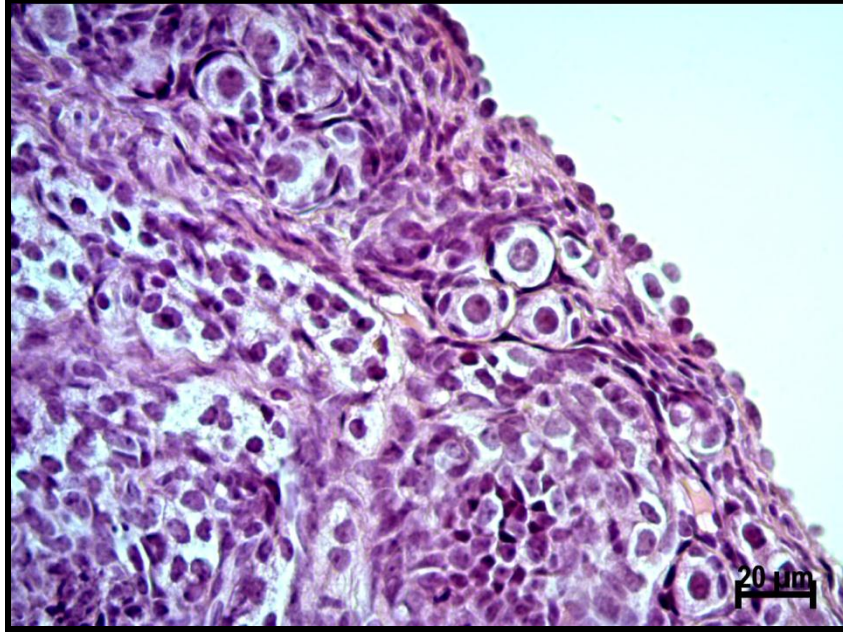
Şekil 14: Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması. Granüloza hücreleri arasındaki bağlantıların korunduğu, granüloza hücre tabakasında fizyolojik sürecin bir parçası olarak az sayıda apoptotik cisim gözlenen, geniş antrumu, kumulus ooforus ve korona radiatası ile bir tersiyer folikül. Folikülü çevreleyen teka tabakası da gözlenmekte.

4.1.2. Shilajit grubuna ait ışık mikroskopik bulgular

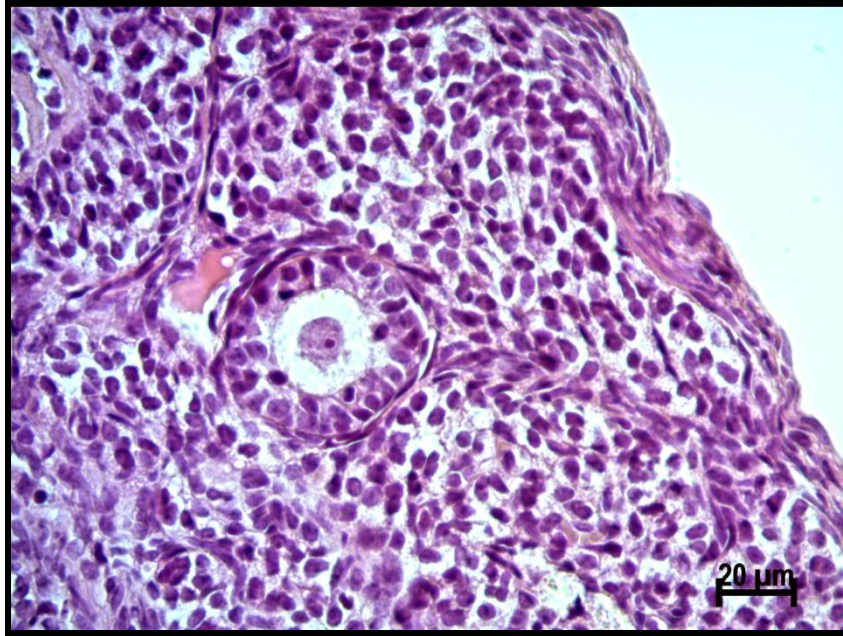
Deney süresince oral yoldan shilajit uygulanan ve iyonizan radyasyona maruz kalmayan shilajit grubundaki deneklerimizden alınan kesitlerin H+E boyamasında, kontrol grubuna benzer şekilde, gelişimin farklı aşamalarına ait normal yapıdaki follikülleri gözlemledik (Şekil 15, 16, 17, 18, 19). Bu grup için yapılan PAS-HL boyamasında da bulgularımız kontrol grubu ile benzerlik arz etmekteydi (Şekil 30).



Şekil 15: Shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması. Kontrol grubuna benzer şekilde farklı gelişim evrelerindeki sağlıklı folliküller gözlenmekte.



Şekil 16: Shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması. Tek katlı kübik görünümlü germinal epitel ile altında ince bir tunika albuginea gözlenmekte. Bu tabakaların altında ise kontrol grubundakilere benzer şekilde gruplar halinde ve normal görünümlü primordial foliküller izlenmekte.



Şekil 17: Shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması. Normal görünümlü oosit çekirdeği, granuloza hücre tabakası ve yeni şekillenmeye başlamış teka tabakası ile bir multilaminar primer folikül gözlenmekte.



Şekil 18: Shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması. Antrumu şekillenmeye başlamış bir sekonder folikül. Oosit, granüloza hücreleri ve teka tabakası normal görünümde. Granüloza hücreleri arasında yer alan az sayıdaki apoptotik cisim fizyolojik süreci yansıtmakta. Yine germinal epitel altında normal görünümlü bir primordial folikül gözlenmekte.



Şekil 19: Shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması. Normal görünümlü sekonder folikülün granüloza tabakasında fizyolojik apoptotik süreci yansıtan apoptotik cisimler görülmekte. Yakın komşuluğunda normal görünümde bir primer folikül yer almakta.

4.1.3. Radyasyon grubuna ait ışık mikroskopik bulgular

Işınlamadan sonraki 4. günde, alınan ovaryum kesitlerinde kontrol grubundan farklı olarak, gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerde granüloza hücre viabilitesinin azaldığı ve foliküllerin neredeyse tamamının atretik görünümde olduğu fark edildi.

Atretik foliküllerde genellikle granüloza hücre tabakasının gevşediği, çok sayıda piknotik çekirdekli granüloza hücrelerinin bulunduğu, gerek granüloza hücre tabakasında ve gerekse antral boşlukta membranla çevrili hücresel atıklardan oluşan apoptotik cisimcikler dikkat çekti. Ayrıca dejenere granüloza hücreleri ve apoptotik cisimciklerin antrum sınırı boyunca yüzdüğü, granüloza hücreleri ile oositlerin birbirlerinden ayrıştığı, granüloza hücrelerinde sitoplazmik kayıplar ve hücrelerde vakuolizasyon olduğu saptandı. Oosit morfolojisinin bozulduğu, piknotik kumulus hücreleri ile çevrili dejenere oositlerin antral boşlukta serbestçe yüzdüğü, teka tabakasının hipertrofiye olduğu ve yer yer granüloza hücrelerinden ayrıldığı görüldü.

Oosit nükleuslarında birçok fragmantasyon görüldü. Yine oosit sitoplazmalarında kaviteleme mevcuttu ki, bu haliyle oosit dejenerasyonu otofajik hücre ölümüne benzemekteydi. Bazı foliküllerde asidofilik özellikteki oosit sitoplazmasının varlığı dikkat çekiciydi.

Kontrol grubuyla benzer şekilde ovaryumu çevreleyen germinal epitelini oluşturan hücrelerin tek katlı kübik epitel karakterinde olduğu tespit edildi. Radyasyon grubunda atretik follikül sayısındaki fazlalık dikkat çekiciydi.

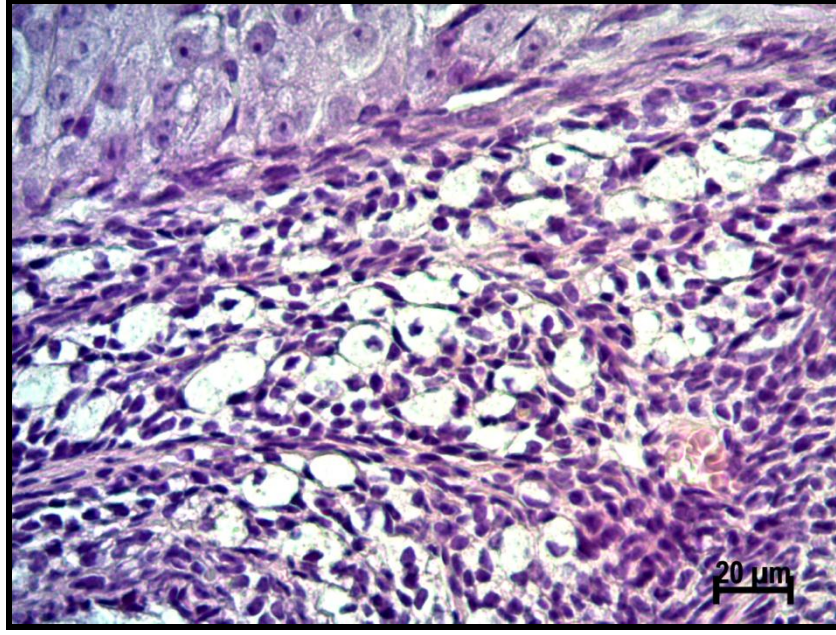
Büyük büyütmelerde korteks incelendiğinde neredeyse hiç normal görümlü primordial foliküle rastlanmadı. Aynı durum primer foliküller için de geçerliydi. Foliküler hücre morfolojisinin bozulmasının yanı sıra primordial ve primer foliküllerin çok büyük kısmı oositten yoksundu. Preantral ve antral foliküllerde ileri atretik değişiklikler mevcuttu (Şekil 20-24).

PAS-HL ile boyanmış kesitlerde yapılan mikroskopik incelemelerde, bazı foliküllerde oositin ZP'den ayrıldığını, özellikle oositi tamamen dejenere olmuş foliküllerde ZP'nin katlantılı bir görünüm aldığı ve yer yer bütünlüğünü kaybettiği görüldü. Atrezi aşamasındaki foliküllerde PAS (+) boyanmış, fragmente ve büyük vakuoller içeren oositler tespit edildi. Antral foliküllerin granüloza hücreleri

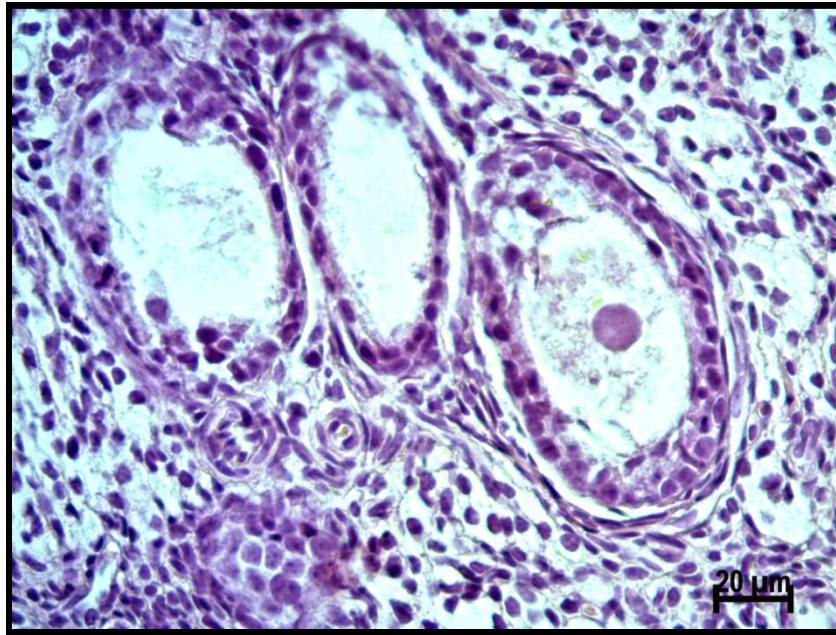
arasında PAS (+) boyanan hücresel artıklar ve granüloza hücreleri ile ZP arasında boşluklar olduğu gözlemlendi (Şekil 30).



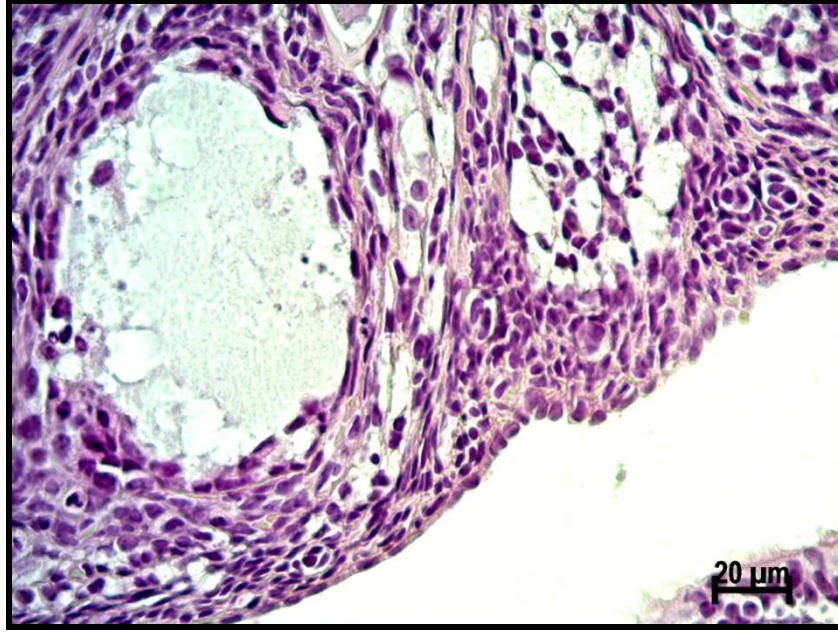
Şekil 20: Radyasyon grubuna ait kesitin H+E boyaması. Ovaryan foliküllerin tamamına yakını atretik görünümde ve oosit sitoplazmasında otofajik hücre ölümünü anımsatan tarzda kaviteleme mevcut. Yine dejenere granüloza hücreleri antrum kenarı boyunca yüzmektedirler. Bu grupta çok nadir gözlenen normal görünümlü bir sekonder folikül dikkat çekmekte.



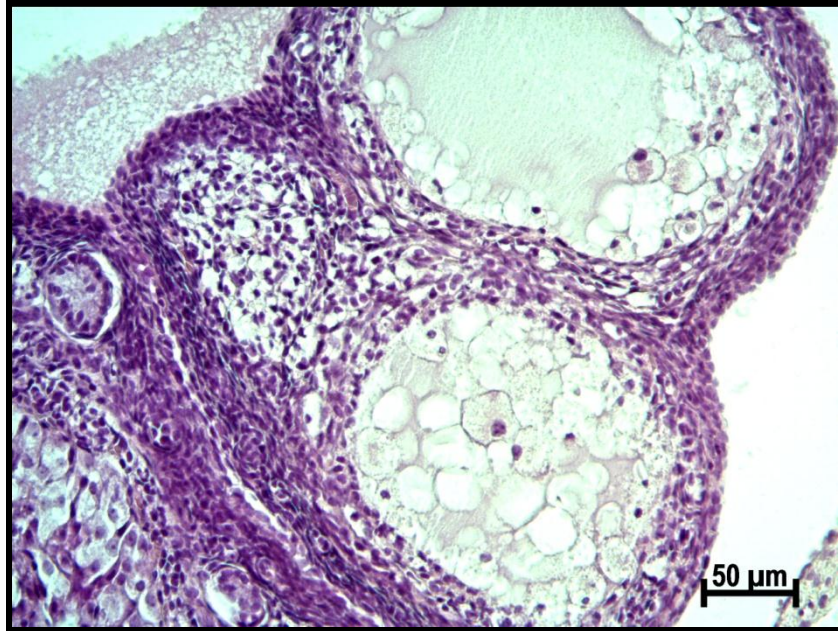
Şekil 21: Radyasyon grubuna ait kesitin H+E boyaması. Primordial folikülleri çevreleyen granüloza progenitor hücrelerinin çekirdekleri piknotik görünümde. Oosit çekirdekleri çoğunlukla görünmemekte, gözlemlenebilenlerin ise piknotik olduğu dikkat çekmekte.



Şekil 22: Radyasyon grubuna ait kesitin H+E boyaması. Granüloza hücreleri arasındaki bağlantılar zayıflamış ve hücreler birbirleri ve oosit ile olan ilişkilerini kaybetmiş görünmekte. Yine granüloza tabakasının incelmesi ve teka tabakasından ayrıldığı gözlenmektedir. Granüloza tabakasında çok sayıda apoptotik cisim dikkat çekmektedir.



Şekil 23: Radyasyon grubuna ait kesitin H+E boyaması. Atretik ileri evre folikül duvarında granüloza tabakasının inceldiği ve bu tabakada çok sayıda apoptotik cisim bulunduğu gözlenmekte. Antrumda serbestçe yüzen apoptotik cisimcikler dikkat çekmekte. Primordial foliküllerin tamamına yakını atretik görünüm arz etmekte.

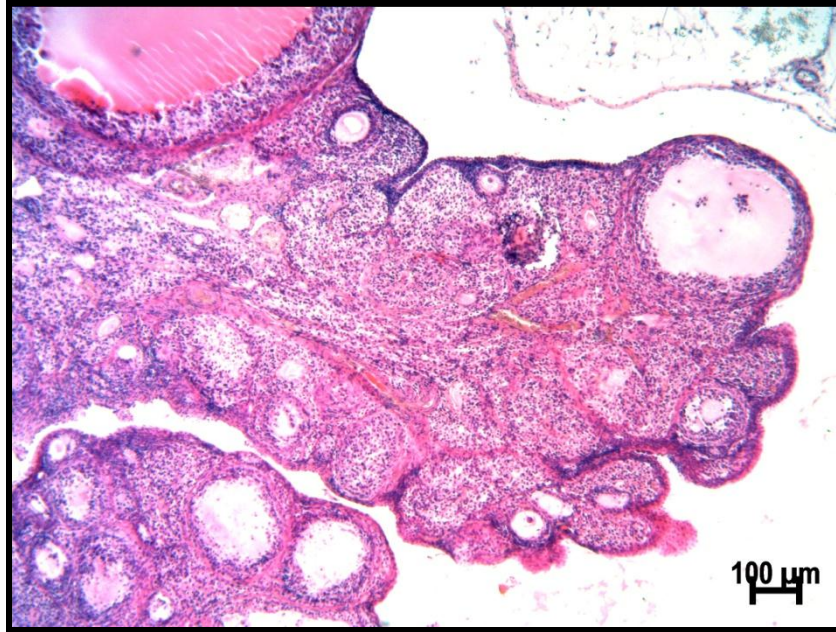


Şekil 24: Radyasyon grubuna ait kesitin H+E boyaması. Granüloza tabakası incelmış olan atretik foliküllerin duvarında ve antrum sınırı boyunca çok sayıda apoptotik cisim gözlenmekte. Oosit sitoplazmasında belirgin kaviteleşme dikkate çekmekte.

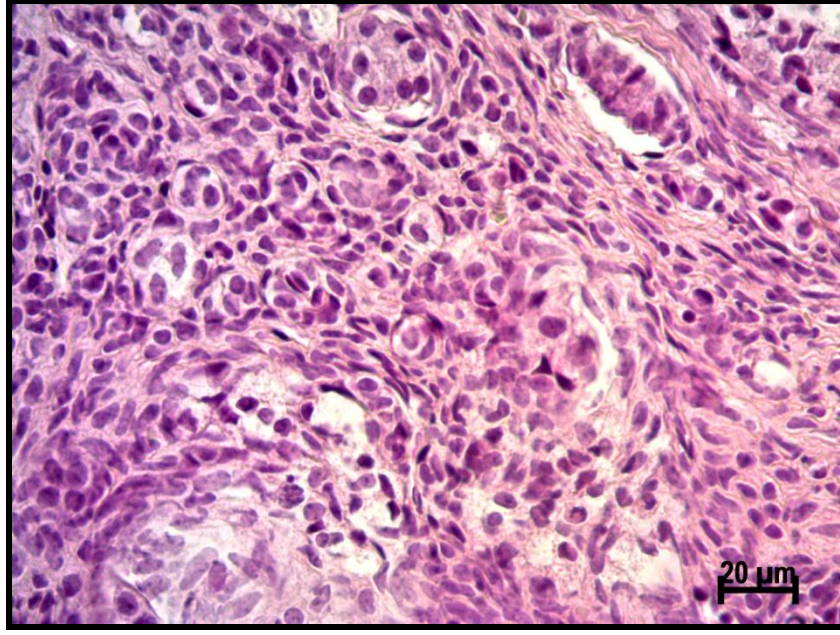
4.1.4. Radyasyon+shilajit grubuna ait ışık mikroskopik bulgular

Bu grupta özellikle preantral evredeki foliküller radyasyon grubuna göre kısmen de olsa daha iyi görünüm arz etseler de iki grubun primer, preantral ve antral folikül sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Yine bu grupta atretik folikül hakimiyeti belirgindi. Bununla birlikte radyasyon+shilajit grubunda az da olsa normal görünümlü primordial folikül gözlemlenerek mümkündür (Şekil 25, 26, 27, 28, 29).

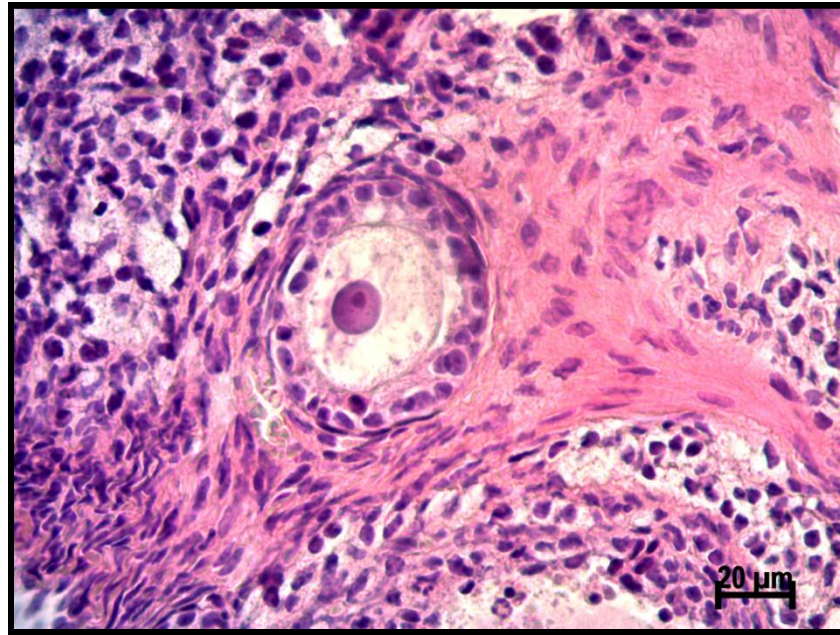
Radyasyon+shilajit grubuna ait kesitlerin PAS+HL boyamasında, atretik folliküllerin dejenere olan oositlerine ait bozuk morfolojili ZP'lerin PAS (+) boyandığını görüldü. Bu folliküllerde yine çok sayıda PAS (+) boyanan granüloza hücreleri gözlemlendi. Granüloza hücre bazal membranları PAS (+) boyanmıştı ve yer yer ondülasyon göstermekteydi (Şekil 30).



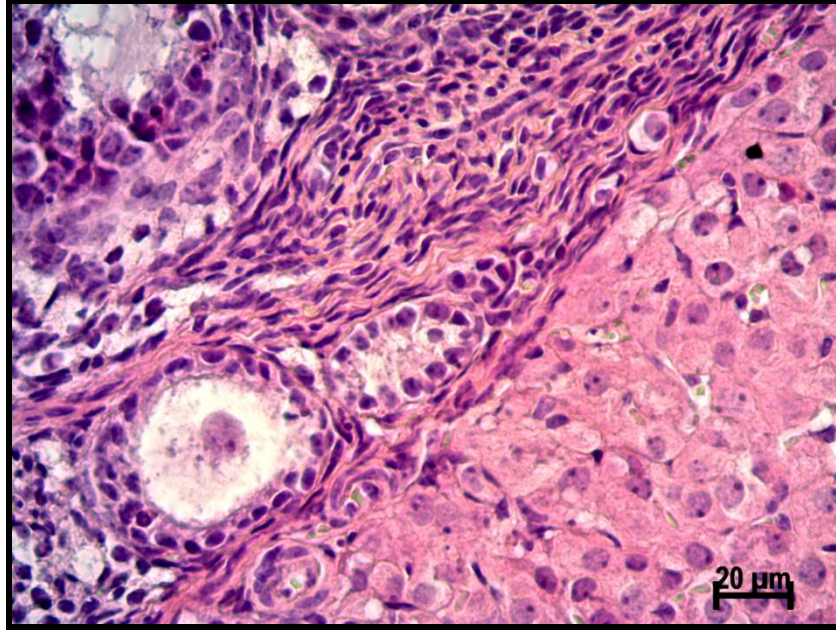
Şekil 25: Radyasyon+shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması. Radyasyon grubuna benzer şekilde radyasyon+shilajit grubunda da foliküllerin büyük çoğunluğu atretik görünümde.



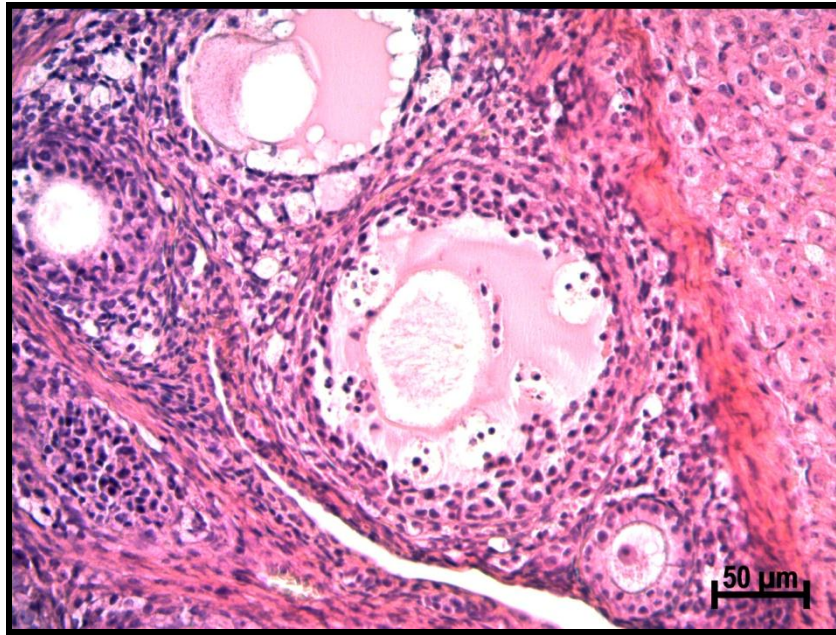
Şekil 26: Radyasyon+shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması. Primordial foliküllerin çoğu atretik görünümde olsa da radyasyon grubundan farklı olarak radyasyon+shilajit grubunda az sayıda da olsa normal görünümlü primordial foliküller gözlenmekte.



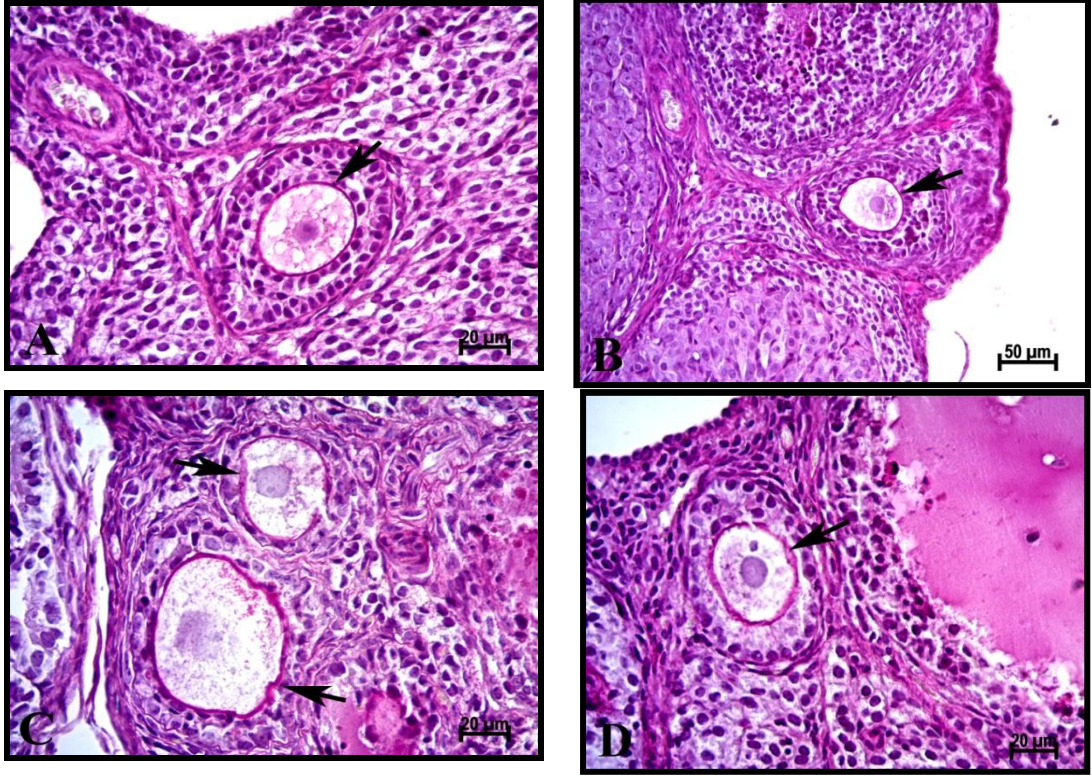
Şekil 27: Radyasyon+shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması. Bu grupta özellikle preantral evre foliküllerde olmak üzere ileri evre foliküllerin bazılarının morfolojilerini kısmen de olsa koruduğu ve granüloza hücrelerinin birbirinden ayrılması ve granüloza tabakasında apoptotik cisimler görülmesi gibi erken apoptotik değişiklikler gösterdiği dikkat çekmekte.



Şekil 28: Radyasyon+shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması. Erken evre apoptotik değişiklikler gösteren bir preantral folikülle birlikte normal görünümlü bir primordial folikül gözlenmekte.



Şekil 29: Radyasyon+shilajit grubuna ait kesitin H+E boyaması. Granüloza tabakasında incelme ve hücrelerin birbirleriyle olan bağlantısının bozulması, bu tabakada ve antrum kenarı boyunca yüzen çok sayıda apoptotik cisim ve oositte vakuolizasyon gösteren atretik foliküller ile birlikte yalnızca granüloza hücrelerinin birbiri ile olan bağlantısının zayıfladığı erken atretik değişiklikler gösteren bir preantral folikül gözlenmekte.



A) Kontrol grubuna ait fotoğrafta, primer folikül içerisinde yer alan oositi çevreleyen zona pellusida (ok) düzenli yapısı ile izlenmekte. B) Shilajit grubuna ait görüntüde, primer folikül içerisinde yer alan oositin etrafını çevreleyen zona pellusidanın (ok) kontrol grubunda olduğu gibi düzenli bir yapı sergilediği izlenmekte. C) Radyasyon grubuna ait görüntüde, primer foliküllerdeki zona pellusida yapısının belirgin olarak bozulduğu dikkat çekmekte (ok). D) Radyasyon + Shilajit grubuna ait fotoğraf görüntüsünde, primer foliküldeki zona pellusida (ok) yapısının sadece radyasyon uygulanan gruba kıyasla daha düzgün olduğu görülmekte.

Şekil 30: Tüm Gruplara ait ovaryum kesitlerinin PAS+HL boyanma görüntüleri.

4.1.5. Gruplara göre folikül sayılarının istatistiksel analizi

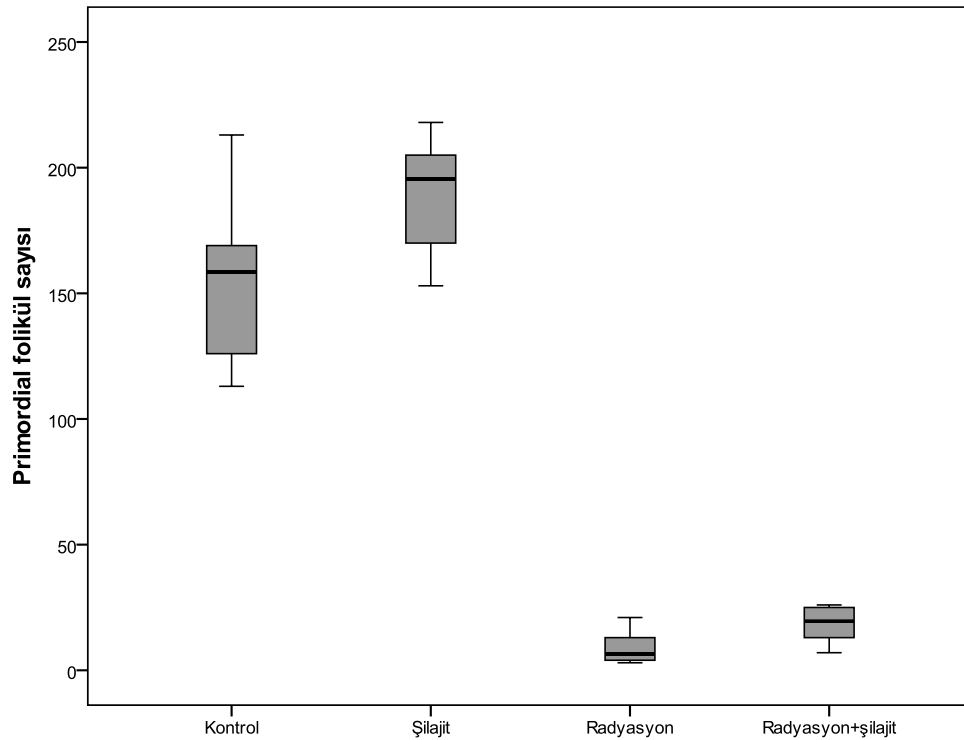
Grupların primordial, primer, preantral, antral ve atretik folikül sayıları için yapılan istatistiksel analiz sonucunda tüm gruplar birbirinden farklı bulundu ($p < 0.001$). Primordial folikül sayısı bakımından yapılan ikili karşılaştırmalarda shilajit grubu ile kontrol grubu arasındaki fark ve radyasyon grubu ile de radyasyon+shilajit grubu arasındaki fark anlamlı bulundu. Diğer foliküler evreler için yapılan tüm ikili karşılaştırmalarda ise kontrol ile shilajit grubu, radyasyon grubu ile de radyasyon+shilajit grubu benzer bulunurken diğer tüm karşılaştırmalar anlamlı bulundu (Tablo 5) (Grafik 1 ve 2).

Tablo 5: Sağlıklı ve atretik folikül sayılarının gruplara göre dağılımı.

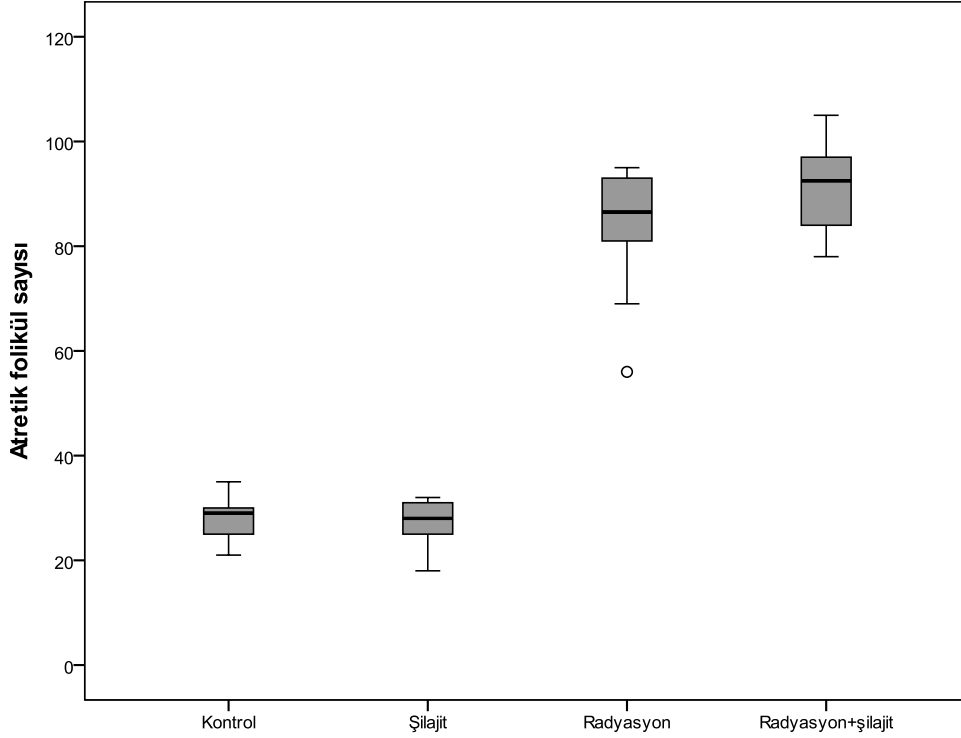
	Kontrol n=10	Şilajit n=10	Radyasyon n=10	Radyasyon+Şilajit n=10
Primordial	158.50 (113-213) ^a	195.50 (153-218) ^b	6.50 (3-21) ^c	19.50 (7-26) ^d
Primer	34.50 (26-63) ^a	41.00 (30-57) ^a	2.50 (0-5) ^b	2.00 (0-5) ^b
Preantral	10.50 (6-18) ^a	12.50 (7-19) ^a	3.00 (1-5) ^b	3.00 (0-7) ^b
Antral	5.00 (1-10) ^a	6.00 (2-19) ^a	0.00 (0-3) ^b	0.00 (0-1) ^b
Atretik	29.00 (21-35) ^a	28.00 (18-32) ^a	86.50 (56-95) ^b	92.50 (78-105) ^b

* Aynı harfler benzer grupları göstermektedir.

Grafik 1: Gruplara göre primordial folikül sayıları.



Grafik 2: Gruplara göre atretik folikül sayıları.



4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.2.1. Kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

Primordial ve primer foliküllerde p53 ekspresyonu gözlenmedi. Grubun genelini oluşturan normal morfolojili ileri evre foliküllerde zayıf ekspresyon gösteren granüloza hücreleri dışında ekspresyon gözlenmedi. Atretik foliküllerde özellikle antrum kıyısındaki granüloza hücrelerinde yoğun ekspresyon vardı. Teka tabakasında ekspresyon gözlenmedi. Korpus luteumlarda ise ekspresyon gözlendi. Primer foliküllerde zayıf Bax ekspresyonu görülmesi dışında Bax ve kaspaz 3 ekspresyonunun şekli p53 ekspresyonuna benzemekteydi (Şekil 31-33).

4.2.2. Şilajit grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

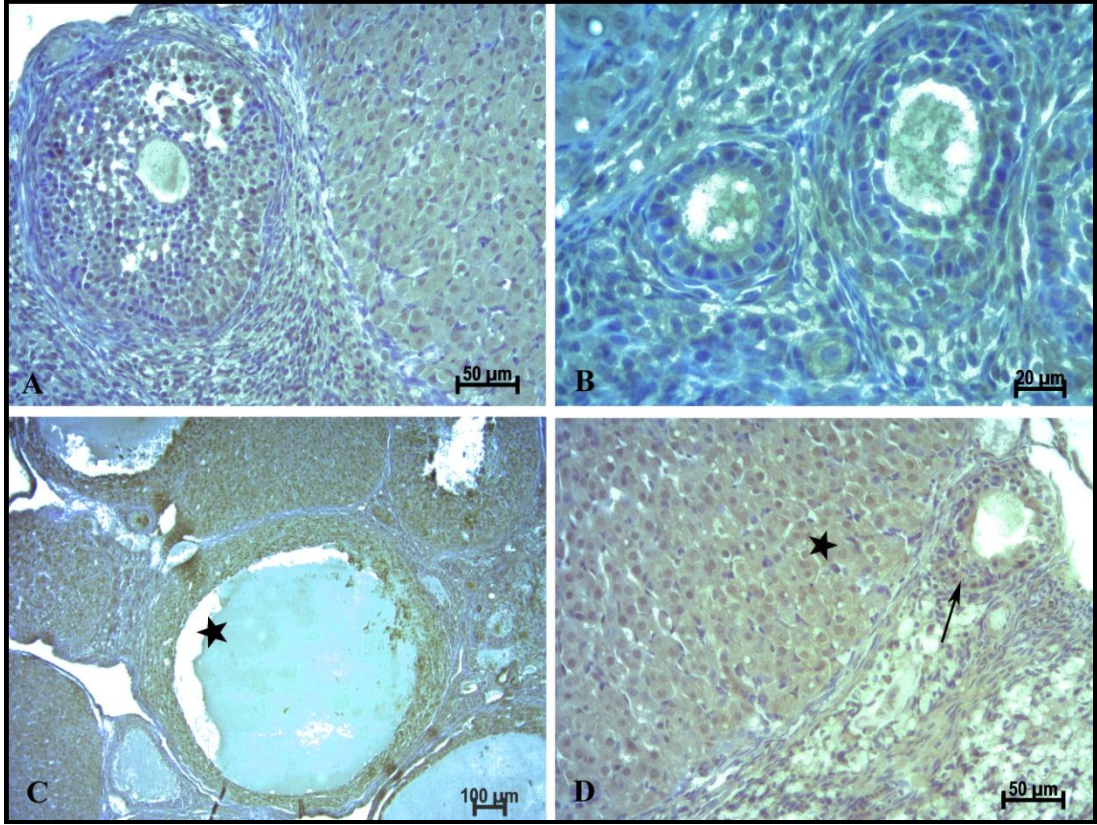
Kontrol grubu ile benzerdi (Şekil 31-33).

4.2.3. Radyasyon grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

Tüm evrelerdeki foliküllerin tamamına yakını atretikti. Primordial folikül gözlenemedi. Primer foliküllerde kuvvetli p53, Bax ve kaspaz 3 ekspresyonu mevcuttu. Büyük foliküllerin granüloza hücrelerinde de özellikle antrum boyunca yoğun p53, Bax ve kaspaz 3 ekspresyonu mevcuttu. Teka tabakasında ekspresyon Bax ekspresyonu dışında gözlenmedi. Korpus luteumdaki p53, Bax ve kaspaz 3 ekspresyonları granüloza tabakasına göre daha zayıf ancak kontrol ve shilajit grubuna göre daha şiddetli idi (Şekil 31-33).

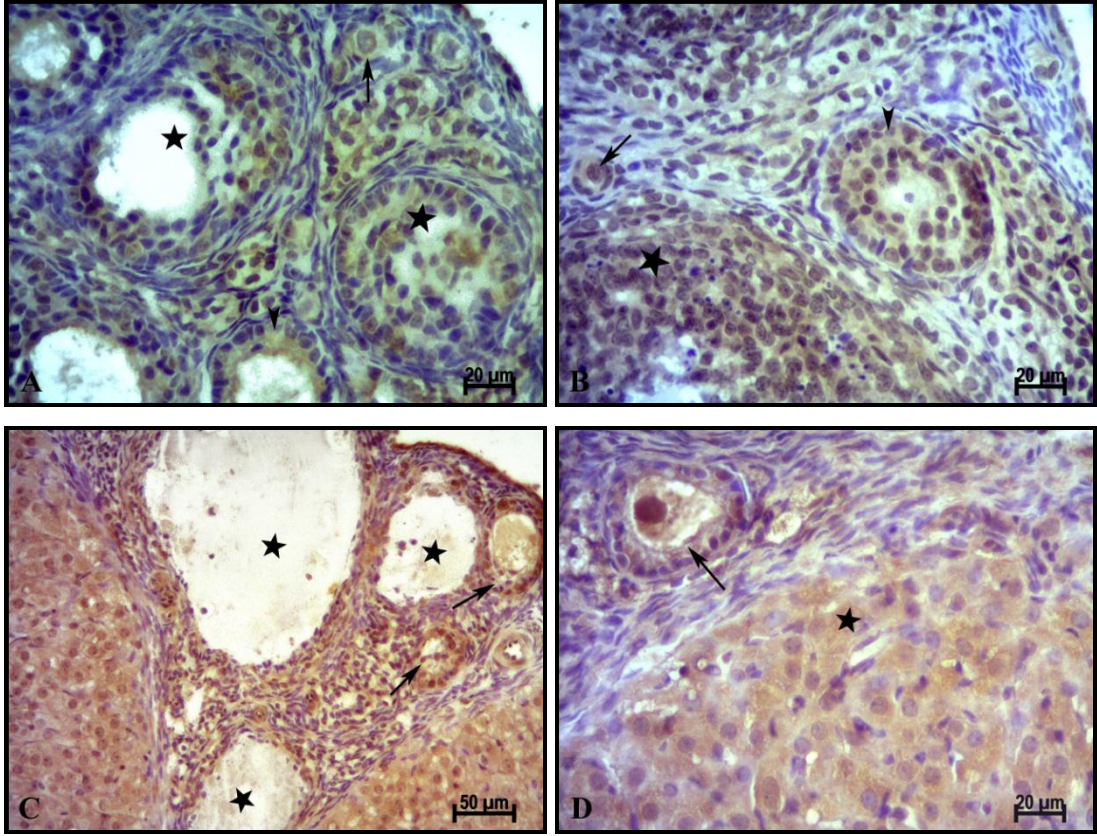
4.2.4. Radyasyon+shilajit grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

Bu grupta da foliküllerin çoğu atretikti. Az sayıdaki primordial foliküllerde p53 ekspresyonu yok ya da zayıftı. Yine çok az sayıda da olsa zayıf p53 ekspresyonu gösteren primer ve preantral foliküller gözlendi. İleri evre foliküllerde yaygın ekspresyon gözlenmekle birlikte bu grupta ekspresyonun radyasyon grubuna göre daha zayıf olduğu ve kısmen normal görünüm arz eden preantral ve daha ileri evre foliküllere rastlanması dikkat çekiciydi. Teka tabakasında ekspresyon gözlenmedi. Korpus luteumlarda p53 ekspresyonu granüloza tabakasına göre zayıf, kontrol ve shilajit gruplarına göre ise kuvvetliydi. Primer foliküllerde Bax ve kaspaz 3 ekspresyonu yoğundu. Diğer foliküler evrelerde Bax ve kaspaz 3 ekspresyonunun şekli p53 ile benzerdi (Şekil 31-33).



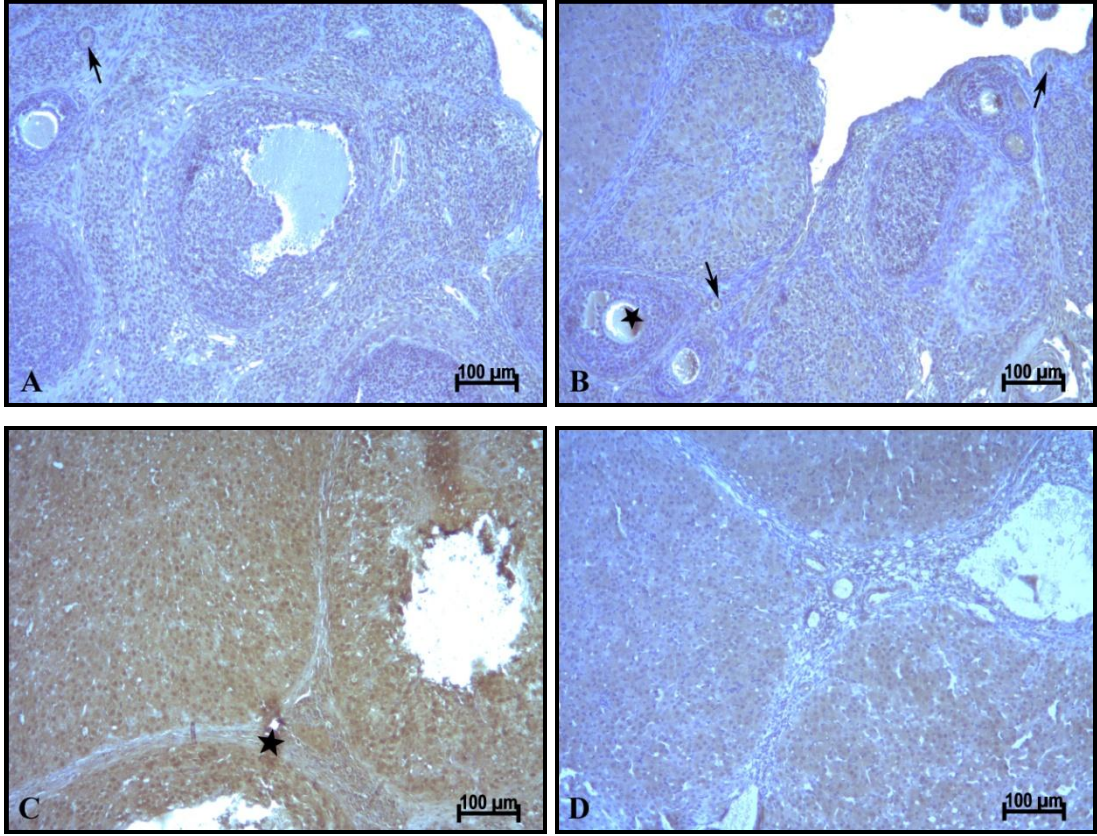
A- Kontrol grubunda granüloza hücrelerinde çok düşük ekspresyon varken teka tabakasında ekspresyon gözlenmemekte. Korpus luteumlarda ise p53 ifadesi daha şiddetli izlenmekte. B- Shilajit grubu p53 ekspresyonu açısından kontrol grubuna benzemekte. C-Radyasyon grubunda özellikle antrum kıyısındaki (yıldız) granüloza hücrelerinde ve kopus luteumlarda yoğun ekspresyon varken, teka tabakasında çok zayıf bir ekspresyon gözlenmekte. D- Radyasyon+shilajit grubunda nispeten normal görünümlü ve radyasyon grubuna göre granüloza hücrelerinde p53 ekspresyonunun daha zayıf olduğu bir preantral folikül (ok) izlenmekte. Korpus luteumda (yıldız) ekspresyon mevcut.

Şekil 31: Tüm gruplarda p53 ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.



A- Kontrol grubunda primordial foliküllerin granüloza progenitor hücrelerinde ekspresyon yok (ok). Yine ileri evre foliküllerin granüloza hücrelerinde zayıf ekspresyon mevcut (yıldız). Teka tabakalarında ekspresyon gözlenmiyor. B- Shilajit grubu kontrol grubu ile benzerlik göstermekte Primordiyal follikül (ok), preantral follikül (ok başı), Granüloza tabakası (yıldız). C- Radyasyon grubunda granüloza tabakasında ve korpus luteumlarda yoğun ekspresyon mevcut. Yine teka tabakasında da ekspresyon gözlenmekte. Çeşitli evrelerdeki atretik folliküller (yıldız) ve preantral folliküller (oklar). D- Radyasyon+shilajit grubunda çokça gözlediğimiz normale yakın görünümde bir preantral folikülde granüloza tabakasında ve yeni şekillenen teka Bax ekspresyonu zayıf olarak gözlenmekte. Korpus luteumlarda (yıldız) ise ekspresyon mevcut.

Şekil 32: Tüm gruplarda Bax ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.



A- Kontrol grubunda normal görünümlü bir primer folikülün (ok) ve ileri evre foliküllerin granüloza hücrelerinde kaspaz 3 ekspresyonu gözlenmiyor. B- Shilajit grubunda primordial foliküllerin granüloza progenitör hücrelerinde ileri evre foliküllerin granüloza hücrelerinde ekspresyon gözlenmiyor. Antral follikül (yıldız), teka tabakası (yıldız) C- Radyasyon grubunda granüloza hücrelerinde ve korpus luteumlarda yoğun ekspresyon gözlenmekte. Teka tabakasındaki (yıldız) ekspresyon ise zayıf ancak kontrol ve shilajit gruplarındaki teka tabakasına göre daha belirgin. D- Radyasyon+shilajit grubundaki granüloza hücrelerinde kaspaz 3 ekspresyonu radyasyon grubuna göre zayıf olarak gözlenmekte. Korpus luteumlardaki ekspresyon ise yine belirgin olarak gözlenmekte.

Şekil 33: Tüm gruplarda Kaspaz ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.

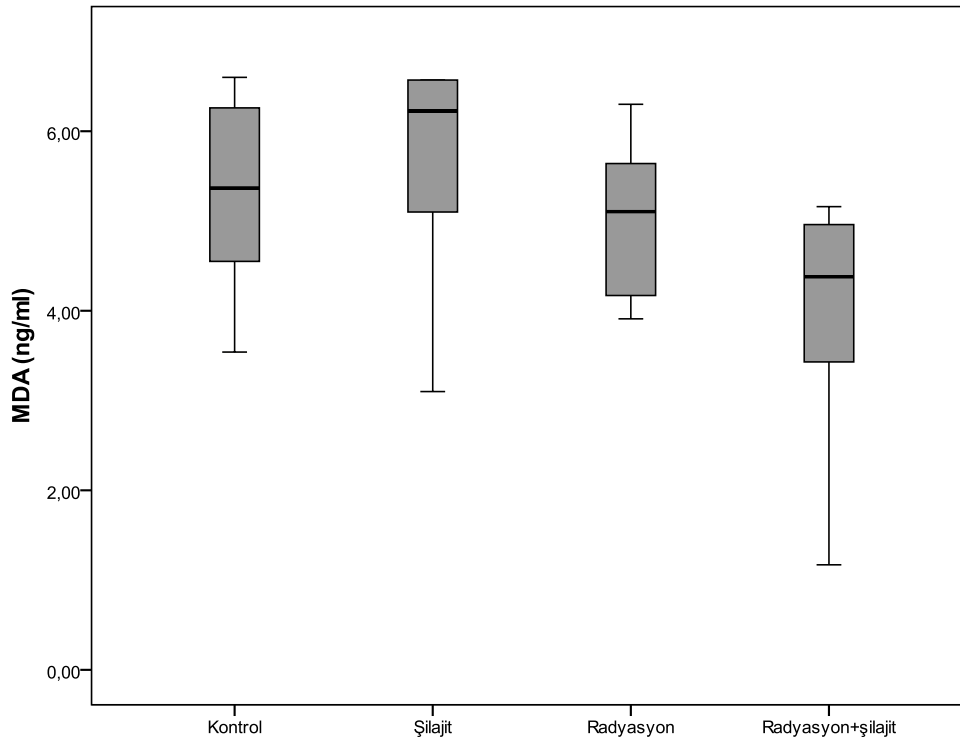
4.3. MDA ve Total Antioksidan Kapasite

MDA değerleri bakımından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.144$). Ancak en düşük değer radyasyon+şilajit grubunda gözlemlendi. Total antioksidan kapasite (TAK) değerleri bakımından yine gruplar arasında fark bulunamadı ($p=0.329$). Bununla birlikte radyasyon+şilajit grubundaki TAK değerinin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da radyasyon grubundan yüksek olması dikkat çekiciydi (Tablo 6) (Grafik 3 ve 4).

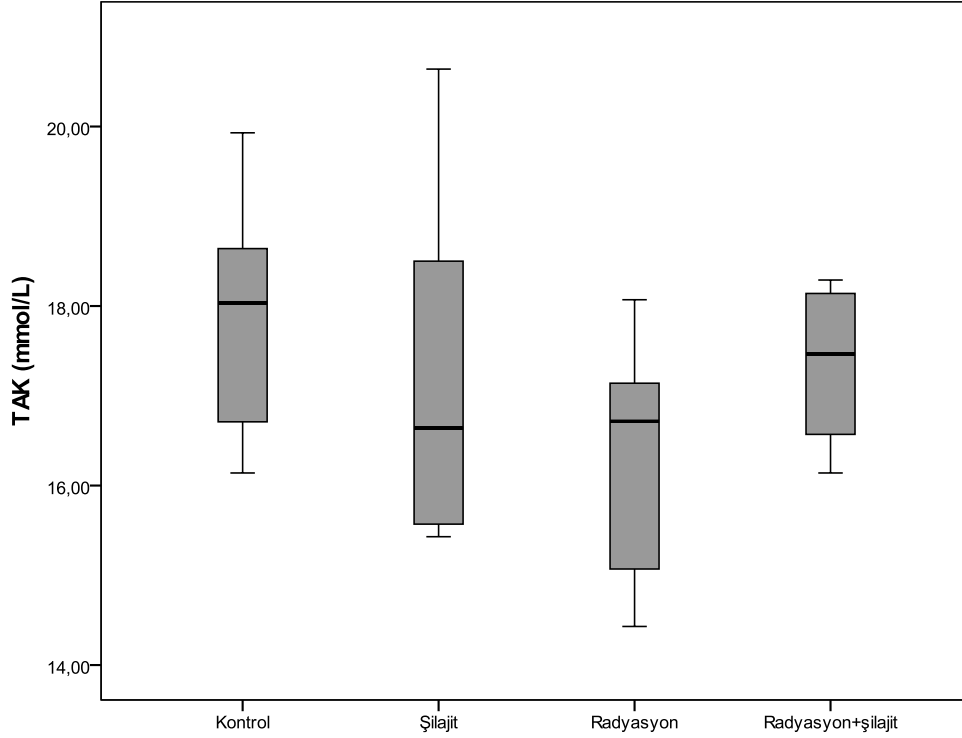
Tablo 6: MDA ve total antioksidan kapasite değerleri.

	Kontrol n=10	Şilajit n=10	Radyasyon n=10	Radyasyon+Şilajit n=10
MDA	5.36 (3.54-6.6)	6.22 (3.1-6.57)	5.1 (3.91-6.3)	4.38 (1.17-5.16)
TAK	18,03 (16,14-19,93)	16,64 (15,43-20,64)	16,71 (14,43-18,07)	17,46 (16,14-18,29)

Grafik 3: Gruplara göre MDA değerleri (ng/ml).



Grafik 4: Gruplara göre TAK değerleri (mmol/l).



4.4. Deneklerin Total Vücut Ağırlığında Meydana Gelen Değişiklikler

Deneyin ilk günü, radyasyon uygulanan gün, radyasyon uygulanmasından 24 saat sonra ve sakrifikasyon günü ölçülen denek ağırlıkları değişimi tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulundu (1'inci, 10'uncu ve 14'üncü gün için $p < 0.001$, 11'inci gün için $p < 0.002$). 1'inci gün için yapılan ikili karşılaştırmalarda kontrol ve şilajit grupları birbirine benzer bulunurken diğer karşılaştırmalar anlamlı bulundu. 10'uncu ve 14'üncü gün için yapılan ikili karşılaştırmalar tüm ikili kombinasyonlar için anlamlı bulundu. 11. gün için yapılan ikili karşılaştırmalarda ise kontrol, radyasyon ve şilajit grupları benzer bulunurken radyasyon+şilajit grubu diğer gruplardan farklı bulundu.

Yine yapılan grup içi karşılaştırmalarda ağırlıkların zaman içi değişimi tek tek tüm gruplarda anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Kontrol ve şilajit gruplarında ağırlıklar zaman içinde anlamlı düzeyde artış göstermişti. Radyasyon ve radyasyon+şilajit gruplarında yapılan grup içi ikili karşılaştırmalarda ise 1 ve 14'üncü gün ağırlıkları arası fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Ağırlıkların yüzde değişimleri açısından incelendiğinde ise Radyasyon ve Radyasyon+Shilajit gruplarının ağırlıkları bakımından yüzde değişimleri arasındaki fark anlamlı bulunmazken, Kontrol ve Shilajit gruplarının ağırlıkları bakımından yüzde değişimleri arasındaki fark anlamlı bulundu ($p<0.001$) (Tablo 7).

Tablo 7: Günlere göre deney ağırlığı değişimi ve ağırlık değişim yüzdesi tablosu.

	Kontrol n=10	Shilajit n=10	Radyasyon n=10	Radyasyon+Shilajit n=10
Başlangıç denek ağırlığı	92.50 (81-97) ^a	94.50 (82-101) ^a	103.50 (98-134) ^b	119.50 (98-134) ^c
10. gün ağırlığı (Işınlama günü)	121.00 (106-127) ^a	128.00 (110-134) ^b	130.00 (127-146) ^c	148.50 (121-163) ^d
11. gün ağırlığı	122.00 (108-130) ^a	130.00 (116-135) ^a	124.50 (120-138) ^a	140.00 (114-155) ^b
Sakrifikasyon ağırlığı	134.00 (121-144) ^a	146.00 (130-155) ^b	106.50 (100-113) ^c	117.50 (103-134) ^d
Ağırlıkların % değişimi	47.80 (36.08-50.00) ^a	54.46 (48.42-62.77) ^b	1.45 (-5.66-15.96) ^c	(-)0.41 (-8.40-5.10) ^c

*Aynı harfler benzer grupları göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Tüm memelilerde ovaryan foliküllerin büyük kısmı folikül atrezisi denen bir mekanizma ile dejenere olur. Dejenere olmuş bu foliküllerin ise granüloza hücrelerinde piknotik nükleusların artması, teka tabakasında hipertrofi ve rüptüre ya da ondüla bazal membran gibi kendilerine özgü morfolojik özellikleri vardır (151, 115). Ovaryan foliküler dejenerasyon ya da atrezi dejenere foliküllerin koordine bir şekilde elimine edildiği, hormonal olarak kontrol edilen apoptotik bir süreçtir (114). Foliküler atrezi intrensek ya da ekstrensek sinyaller aracılığı ile foliküler gelişimin herhangi bir aşamasında meydana gelebilir (152, 153). Foliküler atreziyi uyaran patolojik stimuluslardan biri de iyonizan radyasyondur (13). Hem normal hem de tümoral dokuda apoptoz spontan olarak oluşabileceği gibi radyasyonla da indüklenebilir (14). Güncel çalışmalar radyasyonun foliküllerde apoptozu indüklediğini, oositte kromozomal hasara neden olduğunu ve ovaryan fonksiyonları bozduğunu göstermiştir (14, 15).

Spalding ve ark. tüm vücut 7.5 ve 30 Gy gibi iki farklı dozda ışınlanan sıçanlarda preantral ve graaf foliküllerin histolojik duyarlılık gösterdiklerini ortaya koymuştur (154).

Mole ve ark. yüksek doz radyasyonun etkisiyle rat overlerinde atretik foliküllerin baskın hale geldiğini belirtmişlerdir (155).

Lee ve ark. sıçan ve fare overlerinde gamma radyasyonla oluşan değişiklikleri incelemek amacıyla sıçanları 3.2 ve 8.0 Gy, fareleri ise 2.9 ve 7.2 Gy tüm vücut radyasyona maruz bırakmışlar ve radyasyon sonrası 0, 4 ve 8. günde sakrifiye ettikleri deneklerin overlerindeki histolojik değişiklikleri gözlemlemişlerdir. Atretik folikül yüzdesinin, 4. günde sakrifiye edilen deneklerde 0. günde sakrifiye edilenlere göre anlamlı derecede fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. Buna karşın 4. ve 8. gün arasında atretik folikül yüzdesi arasındaki fark bakımından anlamlı bir değişiklik bulamamışlardır. Yine aromataz aktivitesi ve çekirdek piknozu ile değerlendirilen granüloza hücre viabilitesi 4. günde, 0. güne göre anlamlı ölçüde düşmüş, buna karşın 8. günde kontrol grubu düzeylerine dönmüştür. Atretik folikül yüzdeleri bakımından düşük ve yüksek doz radyasyon uygulanan gruplar arasında fark bulunmamıştır (156). Biz de çalışmamızda deneklerimizi ışınlamadan sonraki 4.

günde sakrifiye ettik ve radyasyon verilen gruplarda atretik folikül sayısının kontrol ve shilajit grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış sergilediğini gösterdik ($p<0.001$).

Lee ve ark.'nın gamma radyasyonla primordial ve primer foliküllerde meydana gelen morfolojik değişiklikleri inceledikleri bir çalışmada 3 haftalık dişi fareleri 8.3 Gy (LD 80) radyasyona maruz bırakmışlardır. Işınlama sonrası overler 3, 6 ve 12. saatlerde toplanarak yarı ince kesitlerde incelenmiştir. Normal primordial ve primer foliküllerin atretiklere oranının zamanla azaldığını gözlemlemiştir. Radyasyon sonrası 6. saatte dejenere primordial foliküller anlamlı oranda artmıştır. Germinal veziküller kaybolmuş, granüloza hücreleri yuvarlaklaşmış ve apoptotik cisimcikler görülmeye başlamıştır. Normal primordial foliküllerin atretik olanlara oranı kontrol grubunda 62.5 iken radyasyon grubunda bu oran 0, 3, 6, ve 12. saatlerde sırasıyla 51.6, 49.0, 11.1, 7.1 olmuştur. Normal primer foliküllerin atretiklere oranı, kontrol grubunda 81.3 iken radyasyon grubunda 0, 3, 6, ve 12. saatlerde sırasıyla 80.0, 75.0, 45.5 ve 33.3 bulunmuştur. Özellikle 6. ve 12 saatte normal primordial ve primer folikül sayılarındaki azalma anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$). Dejenerasyonun, nispeten intakt bir oositle birlikte bir ya da daha çok granüloza hücrelerinin apoptozu, intakt folikül hücreleri ile birlikte oositte apoptoz ya da her iki hücre tipinde de apoptoz şeklinde olabileceği gözlenmiştir (157). Biz de çalışmamızda primordial ve primer foliküllerin sayısının radyasyon verilen grupta kontrol ve shilajit gruplarına göre anlamlı düzeyde azaldığını, buna karşın radyasyon+shilajit grubundaki primordial folikül sayısının radyasyon grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu gözlemledik ($p<0.001$). Radyasyona maruz bırakılan gruplarda foliküler hücre morfolojisinin bozulmasının yanı sıra primordial ve primer foliküllerin çok büyük kısmı oositten yoksun olarak gözlendi.

Morfolojik olarak apoptoz, hücrenin kondensasyonu ve tomurcuklanması, iyi korunmuş organelleri içeren membranla çevrili apoptotik cisimlerin oluşmasını ve bunların komşu hücrelerce ve inflamatuvar yanıt olmaksızın fagosite edilip sindirilmesini içerir (158).

Lee ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada prepübertal fareler tüm vücut 7.2 Gy (LD50) radyasyona maruz bırakılmıştır. Işınlamadan önce ve ışınlama sonrası 1., 2. ve 3. gün overler toplanıp morfolojik değişiklikler incelenmiştir. En geniş kesitlerde

atretik ve PNL ile infiltre foliküllerin oranı hesaplanmıştır. Kontrol grubu erken atretik foliküllerinde hem apoptotik hem de mitotik hücreler gözlemlenmiş, yer yer folikül kavitesi nötrofillerce infiltre edilmiştir. Bununla birlikte 2. gün overlerindeki atretik foliküllerde çok sayıda hücre parçası, apoptotik hücre ve cisimcikler ve çok sayıda nötrofil gözlenmiştir. Kontrol grubunda antral ve preantral evredeki atretik foliküllerin oranı sırasıyla 58.0 ± 8.6 ve 27.3 ± 11.2 iken 2. günde bu oran sırasıyla 94.0 ± 3.4 ve 86.9 ± 7.6 olmuştur. Kontrol grubunda bir ya da daha fazla nötrofil içeren preantral ve antral evredeki atretik foliküllerin tüm atretik foliküllere oranı 29.3 ± 12.0 olarak bulunurken bu oran 2. ve 3. günde sırasıyla 65.9 ± 11.5 ve 57.8 ± 15.4 olmuştur. Bu nedenle radyasyonun foliküllerde apoptotik ve inflamatuvar değişiklikleri tetiklediği sonucuna varılmıştır (159).

Şimşek ve ark. tüm vücut ışınlanan sıçanlarda resveratrol'ün ovaryan toksisite üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. Bu amaçla sıçanlara önce 10 mg/kg ve 100 mg/kg olmak üzere farklı iki dozda resveratrol kürü uygulamışlar ve bundan 24 saat sonra denekleri tüm vücut iyonizan radyasyona maruz bırakmışlardır. Sonuçta resveratrol verilen gruplarda primordial, sekonder ve toplam folikül sayılarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$). Primer folikül sayısı 10 mg grubunda 100 mg grubuna göre yüksek bulunmuş ve bu sonuç 100 mg/kg dozunda verilen resveratrol'ün proapoptotik etkisine bağlanmıştır (37).

Biz de çalışmamızda gerek radyasyon gerek ise radyasyon+shilajit gruplarında normal görünümlü preantral ve antral evre folikül sayılarının anlamlı düzeyde azaldığını gözlemledik. Bu gruplarda preantral foliküller için ortanca değerini her iki grupta da 3.00 ve antral foliküller için ortanca değerini yine her iki grupta 0 olarak bulduk ($p < 0.001$). Bununla birlikte radyasyon+shilajit verilen gruptaki atretik preantral foliküllerin morfolojik olarak atretik antral foliküllere göre bütünlüklerini kısmen korudukları ve erken evre atretik folikül morfolojisi sergileme eğiliminde olduklarını tespit ettik. Bu açıdan bakıldığında terapötik indeksi yüksek olan shilajit'in (160) daha yüksek dozlarda ileri evre foliküller üzerinde olumlu etkileri olacağını düşünmekteyiz.

Gelişen foliküller atretik foliküllere dönüşürken teka hücreleri proliferer olur ve interstisyel hücrelere dönüşür. Granülosa hücreleri de dejenere olur (161). Nishida ve ark. yaptıkları bir çalışmada, fareleri tek doz 400R (~ 4 Gy) abdominal olarak

ışınlamıştır. Radyasyondan sonraki 7. güne kadar her gün 5 fare ve daha sonra 7. haftaya kadar her hafta 5-8 fare sakrifiye edilerek ovaryumları incelendiğinde ışınlamadan 2 hafta sonra primordial foliküllerin neredeyse tamamen yok olduğunu, matür foliküllerin ise farklı atretik folikül şekilleri sergilediklerini gözlemlemişlerdir. Bazı foliküllerde ise oositin de kaybolduğu, büzülmüş ya da kollabe olmuş ZP kalıntısının kaldığı, bazı foliküller dejenerasyona dirençli gibi görünseler de bunlarında sitoplazmalarında depozitlerle karakterize dejenerasyonun başladığı gözlenmiştir. Yine teka hücrelerinin proliferate olduğu, çoğalan bu hücreler ile interstisyel hücreler arasında belirgin bir sınır fark edilemediği saptanmıştır. 5. haftada foliküllerin sadece ZP kalıntısı içeren atretik foliküllere dönüştüğü görülmüştür (162).

Aktaş ve ark.'nın iyonizan radyasyona maruz kalan fare overlerindeki morfolojik değişiklikler üzerine curcuminin antiapoptotik ve proliferatif etkisini araştırdığı bir çalışmada 4 haftalık dişi fareler 8.3 Gy tüm vücut gamma radyasyona maruz bırakılmıştır. Radyasyon grubunda oositlerin uniform görüntüsünü kaybettiği, orijinal boyutuna göre oldukça küçüldüğü, atrezinin geç dönemlerinde tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Atretik foliküllerdeki granüloza hücrelerinin bütünlüklerini kaybettikleri, piknotik granüloza hücrelerinin birbirlerinden ve bazal laminadan ayrıldıkları görülmüştür. Dejenere foliküllerde hücresel debris ve apoptotik cisimcikler artmıştır. İleri atretik foliküllerde kumulus hücreleri ZP'den ayrılmıştır. Işınlama sonrası 3. saatte çok sayıda erken atretik folikül gözlenirken 12. saatte ileri atretik morfolojik özellikler gösteren foliküller 3. saate göre anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Dejenere foliküller ayrıca rüptüre ya da ondüle bazal membran ve dejenere ZP gibi karakteristik özellikler sergilemiştir, yer yer ZP oosit yüzeyinden sıyrılmıştır. Curcumin + radyasyon grubunda atretik folikül sayısı radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir düşüş gözlenmiştir (163). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz, atretik foliküllerde genellikle granüloza hücre tabakasının gevşediği ve birçoğunun piknotik hale geldiği, çok sayıda apoptotik cisim görülmeye başladığı ve apoptotik cisimler ile dejenere granüloza hücrelerinin antral kavitenin kenarları boyunca yüzdüğü, granüloza hücreleri ile oositlerin birbirlerinden ayrıştığı, oosit morfolojisinin bozulduğu, piknotik kumulus hücreleri ile çevrili dejenere oositlerin antral boşlukta serbestçe yüzdüğü, oositin tamamen dejenere olduğu durumda ZP'nin

kollabe ve sıkışmış ya da katlanmış bir hal aldığı, teka tabakasının hipertrofiye olduğu ve yer yer granüloza hücre tabakasının teka tabakasından ayrıldığı görülmüştür. Tüm bu bahsi geçen bulgular yukarıda sözü edilen çalışma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Bizim bulgularımız içinde ayrıca oosit nükleuslarında birçok fragmentasyon ve oosit sitoplazmalarında otofajiye benzer tarzda kavitenme dikkat çekici idi.

PAS-HL ile boyanmış kesitlerde yapılan mikroskopik incelemelerde, bazı folliküllerde oositin ZP'dan ayrıldığını, özellikle oositi tamamen dejenere olmuş foliküllerde ZP'nın katlantılı bir görünüm aldığı ve yer yer bütünlüğünü kaybettiğini gözlemledik. Antral folliküllerin granüloza hücreleri arasında PAS (+) boyanan hücrel artıklar ve granüloza hücreleri ile ZP arasında boşluklar olduğunu saptadık.

Radyoterapi kanser tedavilerinde kullanılan en yaygın yöntemdir. Kanser tedavisi alan hastaların yaklaşık % 80'i tedavilerinin herhangi bir anında gerek tedavi, gerek ise palyatif amaçlı radyoterapiye gereksinim duymaktadırlar. Radyoterapide en iyi sonucun elde edilebilmesi için verilen total radyasyon dozu ile tümöral dokuyu çevreleyen normal dokular için söz konusu eşik değer arasındaki kritik denge gözetilmelidir. Yani bir taraftan en yüksek radyasyon dozu ile en iyi tümör kontrolü sağlanırken diğer taraftan çevre dokular radyasyon hasarına karşı korunmalıdır. Bu nedenle klinik radyoterapi açısından bakıldığında radyoprotektif ajanlar büyük önem arz etmektedir (49).

İyonizan radyasyonun birçok hücrede SOR oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir. Hücre içinde en fazla bulunan madde olan su iyonizan radyasyona maruz kaldığında oluşan dekompozisyon reaksiyonları O_2^- , OH^- , singlet oksijen ve H_2O_2 gibi serbest radikallerin oluşumu ile sonuçlanır. Hidroksil radikallerinin organik moleküllerle etkileşimi sonucu oluşan sekonder radikaller de unutulmamalıdır (164, 165). Oluşan bu radikallerin DNA, proteinler, lipitler gibi kritik hücrel bileşenleri tahrip etme ve sonuçta dokuda oluşan fiziksel ve kimyasal hasarlar ile hücre ölümü ya da neoplastik değişime yol açma potansiyeli vardır. Çoğu durumda iyonizan radyasyon aracılı hücre ölümü apoptoz olarak tanımlanmıştır (47, 48).

Serbest radikaller nedeniyle oluşan oksidatif stres gerek erkek, gerekse kadınlarda üreme fonksiyonlarını etkileyen bir dizi patolojik değişikliklerin

oluşumunu sağlar. Said ve ark. anormal sperm morfolojisinde DNA hasarını oluşturan oksidatif strese NADPH'nin rolünü desteklemektedirler (166).

Agarwal ve ark. Gerek açıklanamayan, gerek ise endometriozisli infertilitede serbest radikallerin rolü olduğunu düşünmüşlerdir (167).

Luteal faz defekti olan hastalarla yapılan randomize, kontrollü, çok merkezli bir klinik çalışmada 750 mg/gün C vitamini verilen hastaların kontrol grubu ile kıyaslandığında daha yüksek gebelik oranları gösterdiği ortaya konmuştur (168).

Melatonin (13), sodyum selenit (169), sfingozin (35), curcumin (163), resveratrol (37) gibi antioksidanların radyasyon ile indüklenen ovaryan toksite üzerine etkilerini inceleyen birçok çalışma yayınlanmıştır.

Bizim çalışmamızda etkinliğini araştırdığımız shilajit'in serbest radikal süpürücü etkisi üzerine birçok çalışma mevcuttur.

Ghosal ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada işlenmiş shilajit'in metil metakrilat'ı hidroksil radikali ile indüklenen polimerizasyona karşı neredeyse tama yakın koruduğu ve metil metakrilat'ın sülfid serbest radikali ile indüklenen polimerizasyonunu anlamlı oranda önlediği gösterilmiştir. Shilajit, nitrik oksit serbest radikallerini etkin bir şekilde berteraf etmiştir ve bu antioksidan etki doz bağımlıdır. Yüksek konsantrasyonlarda shilajit'in serbest radikallere karşı koruyucu etkisi de artmaktadır (125).

Mandlik ve ark. yaptıkları bir çalışmada alloksan ile deneysel olarak diabet oluşturulan sıçanlara bundan 3 gün sonra shilajit'i de içeren polih herbal bir formülasyon olan DRF/AY/5001'i 300 mg/kg ve 600 mg/kg dozda tek doz olarak uygulamışlardır. Deneklerden hazırlanan pankreatik doku homojenatları incelendiğinde, alloksan diabetik sıçanlarda CAT ve GPX gibi antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı, lipid peroksidasyonunun arttığı, gözlemlenirken 300 mg/kg ve 600 mg/kg dozda verilen DRF/AY/5001'in CAT ve GPX düzeylerini arttırdığı, lipid peroksidasyonunu azalttığı görülmüştür (128).

Dinesh ve ark. 21 gün boyunca günde 15 dakika yüzmeye zorladıkları ve böylece kronik yorgunluk sendromu oluşturdukları sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, shilajit'in kompleks enzim aktivitelerini stabilize ederek ve mitokondrial membran potansiyelini koruyarak, kronik yorgunluk sendromunun indüklediği mitokondrial disfonksiyonu önlediğini göstermişlerdir. Shilajit, kronik yorgunluk

sendromu ile indüklenen mitokondrial oksidatif stresi, NO konsantrasyonu, lipit peroksidasyonu, SOD ve CAT aktiviteleri üzerinden geri çevirmiştir. Mitokondrial SOD, NO ve lipit peroksidasyonu ürünleri stres grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artarken shilajit tüm dozlarda bu değişiklikleri anlamlı düzeyde hafifletmiştir. Yine mitokondrial CAT aktivitesi stres grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşüş göstermiş buna karşın shilajit stres ile indüklenen bu değişiklikleri doz bağımlı olarak geri çevirmiştir (129).

Mohamed-I ve ark. bir çalışmada 100 mg/kg ranitidin ve 600 mg/kg shilajit ile 14 gün boyunca oral yoldan tedavi ettikleri sıçanlarda 14. gün etanol ile gastrik ülser oluşumunu indüklemişler, böylece farklı bölgelerin shilajitlerinin etanol ile indüklenen gastrik ülser üzerine etkilerini ranitidin ile de karşılaştırarak incelemişlerdir. Lipit peroksidasyonunu gösteren tiyobarbitürik asit ürünlerinin (TBARs) tüm tedavili gruplarda tedavisiz kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düştüğü gözlenmiş, ranitidin tedavili grupta TBARs düzeyi shilajit verilen gruplara göre düşük bulunurken, Al-Jouf shilajit grubunda TBARs düzeyleri ranitidin ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Yine tüm tedavili gruplarda doku CAT aktivitesi tedavisiz kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiş ve bu artış özellikle Indian ve Al-Jouf shilajitte ranitidin ile kıyaslandığında yine anlamlı bulunmuştur. Son olarak doku SOD aktivitesi ve GSH düzeyleri tüm tedavi gruplarında tedavisiz kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiş bu artış Russian shilajit haricindeki tüm shilajit gruplarında ranitidin ile kıyaslandığında anlamlı bulunmuştur. Yine çalıştıkları shilajit orijinlerinin tümünün sıçanlar üzerinde farklı derecelerde hipolipidemik, antioksidan, antiülser ve etanol ile indüklenmiş ülser üzerine rejeneratif ve onarıcı etkileri olduğunu ve shilajit'in, özellikle de Al-Jouf ve Indian shilajit'in antiülser etkisinin antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antistres, antianksiyete ve rejeneratif etkilerinin bir kombinasyonu yoluyla olduğunu raporlamışlardır (130).

Rege A. ve ark. shilajit'in antioksidan ve anti artritlik özelliklerini değerlendirmek üzere invitro bir çalışma yapmışlardır. Shilajit'in antioksidan özelliklerini DPPH (1,1 diphenyl-2-picryl hydrazyl) radikal süpürücü, lipit peroksidasyonu önleyici etki ölçümleri ve redüktif kapasite ölçümü gibi üç in vitro parametre ile değerlendirmiş ve anti artritlik aktivitesi ise proteinaz inhibitörü etkisi ile değerlendirilmiştir. Shilajit'in serbest radikal

süpürücü etkinliği kolay ve sık kullanılan bir metod olan stabil DPPH radikalinin rengini mordan sarı ya çevirme yeteneği ile (spektrofotometrik olarak 517nm dalga boylu uv ışık kullanılarak) değerlendirilmiş ve doz bağımlı olarak askorbik asit benzeri bir radikal süpürücü etkisi olduğu görülmüştür. Shilajit'in lipit peroksidasyonunu önleyici etkisi hepatosit isolatlarında Fe+2-askorbik asit ile indüklenen lipit peroksidasyonunu önleyici etkisi ile değerlendirilmiştir. Sonuçta shilajit'in MDA düzeylerinde anlamlı bir düşüşe neden olduğu ($p<0,05$) ve lipit peroksidasyonunu önlediği gösterilmiştir. Bir bileşiğin redüktif kapasitesi onun antioksidan potansiyelini yansıtabilir. Bu nedenle shilajit'in redüktif kapasitesi ekstraktlarında Fe+3 ü Fe+2 ye çevirme yeteneği ile değerlendirilmiş ve shilajitiin artan konstrasyonları ile paralel olarak artış gösteren bir redüktif kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir. Shilajit'in, redüktif kapasite yönünden EC50 değerinin 15,2 ile askorbik asit ile karşılaştırılabilir olduğu (13,7) görülmüştür (127).

Sharma ve ark. sağlıklı gönüllü insanlardan oluşan 30 kişilik bir grupta yaptıkları çalışmada, deneklere 45 gün boyunca 2 gr/gün oral yoldan shilajit vermişler ve bu süre sonunda denekleri kan lipit profili ve antioksidan göstergeler bakımından incelemişlerdir. Deney sonunda shilajit'in kan lipit profilini olumlu yönde değiştirdiğini ($p<0.001$) göstermişlerdir. Yine shilajit'in kan SOD, vitamin E ve vitamin C düzeylerini anlamlı ölçüde arttırdığını göstermişlerdir ($p<0.001$) (131).

Vivek ve ark. yaptıkları bir çalışmada sıçanlarda isoproterenol (ISO) ile indüklenen kardiyoktoksisite üzerine shilajit'in kardiyoprotektif etkisi ve bu etkiye shilajit'in antioksidan özelliklerinin yerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada 250 mg/kg ve 500 mg/kg dozlarda oral olarak 91 gün uygulanan shilajit ile ön tedavinin, 85 mg/kg,sc uygulanan ISO ile indüklenen kardiyak nekroz üzerine etkisi değerlendirilmiştir. SGOT, SGPT, LDH ve CK gibi marker enzimler ve redükte glutasyon (GSH), lipit hidroperoksit (LHP), lipit peroksit (LPO) gibi oksidatif göstergeler hem serum hem de kalp kası homojenatlarında ölçülmüştür. Yalnız ISO uygulanan hayvanlarda anlamlı myokardial nekroz, serum marker enzimlerinde anlamlı artış ve endojen antioksidanlarda anlamlı düşüşler saptanırken shilajit serum marker enzimlerinin ve lipit peroksidasyonunun seviyesini düşürüp redükte glutasyonu artırarak anlamlı düzeyde kardiyoprotektif etki göstermiştir. ISO ile birlikte 250 mg/kg ve 500 mg/kg shilajit verilen gruplarda serum kardiyak enzim aktiviteleri yalnızca ISO verilen gruptakinden anlamlı derecede düşüş göstermiştir

($p<0,01$). Özellikle 500 mg/kg grubunda lipit peroksidasyonu anlamlı derecede azalmış ve redükte glutasyon anlamlı derecede artmıştır ($p<0,01$). Kalpte ISO grubunda marker enzimlerde ve redükte glutatyonda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma varken ($p<0,01$), LHP ve LPO değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,01$). Buna karşın shilajit ön tedavisi uygulandığında ISO ile indüklenen tüm bu değişimlerde anlamlı derecede farklılıklar ortaya çıkmıştır ($p<0,01$). Örneğin kalpte marker enzim düzeyleri ve redükte glutasyon anlamlı derecede artış gösterirken lipit peroksidasyonu özellikle de 500 mg/kg grubunda anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,01$). Çalışma sonucunda shilajit'in bu kardiyoprotektif etkinliği muhtemelen endojen antioksidanları arttırması buna karşın membran lipit peroksidasyonunu önlemesine bağlanmıştır (132).

Ghosh ve ark. lipitten zengin diyetle besleyerek hiperlipidemi oluşturdukları sıçanlarda, polih herbal bir formülasyon olan ve hacimce %32 oranında shilajit içeren kumbhajatu'nun anti hiperlipidemik ve antioksidan etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla hiperkolesterolemik sıçanlara 6 gün boyunca oral yoldan kumbhajatu 250 mg/kg ve 500 mg/kg dozda verilmiştir. Bu süre sonunda plazma lipit profili ve karaciğer hücre homojenatlarında SOD ve CAT aktiviteleri ile GSH ve MDA formu üzerinden lipit peroksidasyonu düzeyleri ölçülmüştür. Sonuçta bu formülasyonun plazma lipit profilinde anlamlı bir düzelmeye neden olduğu, her iki dozda da CAT, SOD, glutasyon ve HDL-c konsantrasyonlarını arttırdığı bulunmuştur. Diğer taraftan MDA, kolesterol, trigliserit LDL-c ve VLDL düzeylerinde anlamlı oranda düşüş gözlenmiştir (133).

Biz de çalışmamızda TAK değerleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını gözlemlese de ($p=0.329$) radyasyon+shilajit grubunda TAK değeri radyasyon grubuna göre biraz daha yüksekti. Yine MDA değerleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmasa da ($p=0.144$) özellikle radyasyon+shilajit grubunda MDA'nın ortanca değerinin 4.38 mmol/L ile diğer gruplardan daha düşük olduğunu gözlemledik. Bu açıdan sonuçlarımız yukarıda sözü geçen çalışmalar ile uyumluydu. Bu nedenle radyasyon+shilajit grubundaki primordial folikül sayısının radyasyon grubu ile kıyaslandığında anlamlı oranda yüksek bulunmasını oksidan-antioksidan dengedeki bu düzelmeye ile ilişkilendirmekteyiz.

Shiotani ve ark. bir çalışmada Cu-Zn-SOD'un insanda antral folikülden itibaren teka internada eksprese edildiğini, buna karşın granüloza hücrelerinde eksprese edilmediğini immunohistokimyasal olarak göstermiştir (170). Ishikawa ve ark. matür insan foliküllerinde Cu-Zn-SOD'un teka internada eksprese edilirken granüloza hücrelerinde eksprese edilmediğini göstermiştir (171). Yine Suzuki ve ark. ise Cu-Zn-SOD'u preantral, non-dominant ve dominant foliküllerin teka internasında ve yalnızca dominant foliküllerin granüloza hücrelerinde saptamışlardır (172).

Mn-SOD ise hem insan granüloza hem de teka hücrelerinde eksprese edilir ve steroidojenik enzim ekspresyonlarını kontrol etme potansiyeli taşıyan Ad4BP ekspresyonu ile kuvvetli korelasyon gösterir. Mn-SOD, foliküler gelişim sırasında artan steroidogenez nedeniyle mitokondride oluşan O_2^- radikalinden granüloza ve teka hücrelerinin korunmasında önemli rol oynar. Çünkü normal metabolizmada steroidogenez sırasında mitokondrial ETZ'de O_2^- radikalleri oluşur (171, 173).

Bu bilgiler ışığında her ne kadar bizim çalışmamız ile bu çalışmalarda kullanılan denekler birbirinden farklı olsa da shilajit'in antioksidan destekten (Cu-Zn-SOD) yoksun primordial folikülleri radyasyon kaynaklı SOR'dan korumada etkin olduğunu düşünmekteyiz.

Yalnızca shilajit verilen grupta MDA ve TAK değerleri kontrol grubuna göre anlamlı fark göstermese de bu gruptaki primordial folikül sayısının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek çıkmasını ise verdiğimiz shilajit'in antioksidan özellikleri ile steroidogenez kaynaklı SOR'dan folikülleri koruyan Mn-SOD'un etkisini potansiyalize ederek ovaryan mikroçevredeki oksidan-antioksidan dengeyi olumlu yönde etkilediği şeklinde açıklamaktayız.

Literatür taramalarımızda shilajit'in iyonizan radyasyon maruziyeti sonrası ovaryan folikül atrezisi üzerine etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlamadık. Bu nedenle bu çalışmadaki bir amacımız da ışınlama ile indüklenen apoptozun düzenleyici proteinleri üzerine shilajit'in etkisini değerlendirmektir.

Apoptoz, ovaryan foliküler atrezi ve luteal regresyon için hücrel bir mekanizmadır (174) ve en belirgin özelliği farklı türlerin atretik foliküllerinde ve gerileyen luteal dokularında da gösterilmiş olan, DNA'nın Ca^{+2}/Mg^{+2} bağımlı endonükleazlarca yıkılmasıdır (175). Kaspaz 3'ün iki substratı; aktin ve PARP,

DNaz-1'i inhibe eder (176, 177). Bu DNaz-1'in granüloza ve luteal hücrelerde inaktif halde bulunduğunu ve folikül atrezisi ve luteal regresyon sırasında aktive olması için bir uyarana gerek duyduğunu düşündürmektedir (178).

Birçok hücre tipi için hücre ölümü sırasında kaspaz 3 aktivasyonu ve artmış kaspaz düzeylerinin apoptoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ve bu kaspaz ekspresyonunun apoptoz için anahtar bir rol üstlendiğini düşündürmektedir (179). Kaspaz 3'ü aktive eden uyarılar ise serum gonadotropin çekilmesi, Fas aktivasyonu, radyasyon ve farmakolojik ajanlar gibi çok çeşitlidir (180).

Boone ve ark. yaptıkları bir çalışmada immatür, Sprague-Dawely sıçan ovaryan foliküllerinde anti-eCG (anti- equine chorionic gonadotropin) antiserum ve luteal hücrelerde Prostaglandin F₂ α ile apoptozun arttığını göstermişler ve bunu TUNEL metodu ile doğrulamışlardır. Sonra bu gruplardaki kaspaz 3 ekspresyonu ile TUNEL (-) olan gruplardaki kaspaz 3 ekspresyonu açısından Luteal hücrelerin immunohistokimyasal olarak fark göstermediğini ortaya koymuşlardır. Yani eCG ve hCG (Human chorionic gonadotropin) verilen gruplarda hem corpus luteumda hem de teka hücreleri ve oositte kaspaz 3 varlığı immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Granüloza hücreleri ve interstisyel dokuda ise kaspaz 3 ekspresyonu immunohistokimyasal olarak çok zayıf gözlenmiş ya da hiç gözlenmemiştir. Aksine TUNEL (+) foliküllerin granüloza ve teka tabakaları kaspaz 3 için immun boyanma göstermiştir. Yani sağlıklı foliküllerin granüloza hücrelerinde kaspaz 3 ekspresyonu gözlenmezken gonadotropin çekilmesinden sonra TUNEL (+) olan apoptotik foliküllerin granüloza hücrelerinde kaspaz 3 ekspresyonu gösterilmiştir. Sonuçta kaspaz 3'ün apoptotik sürecin bir parçası olarak granüloza hücrelerinde ekspresyon edildiği, bir başka deyişle gonadotropinlerin granüloza hücrelerinde kaspaz 3 ekspresyonunu düzenleyerek folikül için bir sağkalım faktörü olarak davrandığı ve gonadotropin çekilmesini takiben oluşan granüloza hücre apoptozunun hem artmış kaspaz 3 ekspresyonunun hem de apoptotik sinyale yanıt olarak gerçekleşen proteaz aktivasyonunun bir sonucu olduğu düşünülmüştür (178).

Radyasyonun oksidatif stres yaratmasının yanısıra, iyonizan radyasyon nedeniyle oluşan serbest radikaller sitokrom C'nin mitokondri iç zarından sitozole serbestleşmesini sağlayarak mitokondrial membran bütünlüğünü bozar ve kaspazları aktive ederek apoptozu tetikleyebilirler (181-183).

Said ve ark. iyi bilinen bir radyoprotektör ve antioksidan olan sodyum selenit'in radyasyonla indüklenen folikülogenez üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla seksüel immatür, Sprague-Dawely dişi sıçanları 3.2 Gy (LD₂₀) radyasyona maruz bırakmadan önce 1 hafta boyunca günde bir kez 0.5 mg/kg sodyum selenit kürü uygulamışlardır. Sonuçta kontrol gruplarının granüloza ve teka hücrelerinde kaspaz 3 ve sitokrom C için minimal immun boyanma saptanırken, radyasyonun granüloza ve teka hücrelerinde sitokrom C ve kaspaz 3 ekspresyonlarını belirgin şekilde arttırdığını, buna karşın ışınlama öncesinde sodyum selenit kürü uygulanan sıçanlarda sitokrom C ve kaspaz 3 ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak belirgin bir biçimde düştüğünü göstermişlerdir (184).

İzositrat'ın alfaketoglutarat'a oksidatif dekarboksilasyonunu katalizleyen IDPm (izositrat dehidrojenaz) enzimi aktivitesi için NAD ya da NADH'a gereksinim duyar ve reaksiyon sonunda NADH ve NADPH oluşturur. NADPH ise GSSG'yi tekrar GSH'a çeviren GSR enzimi aktivitesi için gereklidir (185-187).

Oksidatif stres ile apoptoz arasındaki ilişki Lee ve ark.'nın insan promonositik U937 ve HeLa hücreleri ile yaptıkları invitro bir çalışmanın da konusu olmuştur. Bu çalışmada 2 Gy iyonizan radyasyona maruz bırakılmadan önce hücrelerin izositrat dehidrojenaz aktivitesi hücrelere siRNA (Small İnterferin RNA) transfekte edilerek zayıflatılmış ve sonra p53, Bax ve kaspaz 3 gibi apoptotik belirteçlerin ekspresyonları değerlendirilmiştir. Sonuçta iyonizan radyasyon maruziyetini takiben IDPm (-) hücrelerde Bax ekspresyonunun IDPm (+) hücrelere göre anlamlı artış gösterdiği, aynı grupta sitokrom C serbestleşmesinin arttığı, IDPm (+) hücrelerde kaspaz 3 yarıklanmasının yani aktif form oluşumunun azaldığı ve son olarak p53 ekspresyonunun IDPM (-) hücrelerde arttığı gösterilmiştir (188).

Teka hücreleri endojen DNaz-1 içermez. Bu nedenle de tipik olarak teka hücreleri apoptoza gitmezler (175, 189, 190).

Ovaryan granüloza hücreleri ovülasyon ve luteal gerileme gibi fonksiyonlar aracılığı ile ovaryan fonksiyonlar ve fertilité üzerinde anahtar bir rol üstlenmiştir ve açıkçası foliküler atrezi, granüloza hücrelerinin apoptozu ile başlatılır. Radyasyon nedeniyle oluşan ovaryan yetmezlikte ovaryan foliküller yüksek FSH düzeylerine yanıt veremez ve östradiol sentezleyemezler. Bu durumda FSH folikül apoptozunu indükler (191-193).

Fenwick ve ark. (194) fare ovaryan foliküllerinde kaspaz 3 ekspresyonunun hangi foliküler evrelerde meydana geldiğini gözlemlemek için yaptıkları bir çalışmada kaspaz 3'ün morfolojik olarak atreziye gittiği düşünülen foliküllerde hem oosit hem de granüloza hücrelerinde eksprese edildiğini, teka tabakasında hiçbir evrede eksprese edilmediğini, geniş preantral ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde ise eksprese edildiğini gözlemlemiştir. Biz de tüm gruplarda teka tabakasında, radyasyon grubundaki Bax ekspresyonu haricinde ekspresyon gözlemedik. Bone ve ark.'nın yukarıda bahsettiğimiz çalışması (178) ile birlikte değerlendirildiğinde türler arası farkın değişik ekspresyon kalıplarına neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Radyasyon gibi toksinlerin de intrinsek apoptotik yolağı tetikledikleri bilgisi ışığında değerlendirildiğinde Takai ve ark.'nın çalışması da ilginç sonuçlar sunmaktadır. Söz konusu çalışmada araştırmacılar endüstriyel bir kimyasal olan VCD (4-Vinylcyclohexene Diepoxide) maruziyeti sonrası Bax geni defektif farelerde meydana gelen primordial ve primer folikül kaybının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha az olduğu ($p < 0.05$), yine kaspaz 3 defektif farelerde meydana gelen primer folikül kaybının kontrol grubuna göre daha az olduğu ($p < 0.05$) bununla birlikte primordial folikül sayıları bakımından gruplar arası fark gözlenmediğini bildirmişlerdir (195).

Radyasyonun hücredeki yıkıcı etkisi primer olarak apoptotik yanıtı tetikleyen DNA lezyonlarına neden olur. p53 hedef moleküllerinin DNA hasarı p21, Gadd45, Bax, Bcl-2, PARP ve p53'ün kendisini de içeren moleküllerin ekspresyonlarını indükler. p53 genomik stabilitenin sürdürülmesinde merkezi bir rol oynar ve kaspazları ve böylece hücre ölümünü aktive eder (196-198). Kaspazlar proteolitik yıkımla aktive olurlar. Aktif kaspaz 3'ün PARP ve Bcl-2 ailesinin proteolizini indüklediği görülmektedir. proapoptotik Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan Bax düzeylerinin radyasyonla indüklenen apoptozda arttığı, ancak bunun fonksiyonel p53 varlığına bağlı olduğu gösterilmiştir (199).

Yoon ve ark. 6 haftalık ICR (Imprinting Control Region) soyu farelerin ovaryan foliküllerinde radyasyonun neden olduğu değişikliklere karşı radyoterapilerde yaygın olarak kullanılan bir radyoprotektör kimyasal olan amifostinin etkisini değerlendirmişlerdir. Bu amaçla i.p. yolla 70 mg/kg amifostin

verilen denekleri uygulamadan 15 dakika sonra 6.42 Gy tüm vücut γ -radyasyona maruz bırakılmışlardır. Sonuçta radyasyonun Bax ve p53 ekspresyonunu arttırdığını, bununla birlikte radyasyonla kaspaz 3'ün inaktif formunun azalıp aktif formunun artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Işınlama öncesi amifostin ile tedavi edilen gruplarda ise p53 ve Bax ekspresyonu ışınlama grubuna göre hafif düşüş göstermiştir. Aynı grupta amifostinin aktif kaspaz 3 oluşumunu da azalttığı görülmüştür (200).

p21, p53'ün doğrudan transkripsiyonel bir hedefidir ve DNA hasarı ile kuvvetli bir şekilde indüklenir. DNA hasarı p53 ekspresyonunu ve p53'ün nükleusa geçişini artırır ve bu çeşitli genlerin aktivasyonu ile sonuçlanır. Böylece hücre apoptoza ya da hücre siklusu durdurularak eğer mümkün ise DNA hasarının onarımına yönlendirilir (201-203).

Lee ve ark. overde radyasyon aracılığı ile oluşan hücrel ve moleküler değişikliklerin mekanizmasını incelemek amacıyla ICR soyu prepubertal fareleri 6.94 Gy tüm vücut γ radyasyona maruz bırakılmışlardır. Işınlamadan 0,3,6,12 ve 24 saat sonra overler toplanmış p53 ve p21 mRNA ve protein ekspresyonları sırasıyla ters transkriptaz polimerize zincir reaksiyonu ve immunblotlama ile değerlendirilmiştir. p53 ve p21 antijenlerinin immunohistokimyasal lokalizasyonları da ortaya konmuştur. İmmunreaktif p53 ve p21 proteinleri granüloza hücrelerinde eksprese olmuşken teka hücrelerinde p53 ve p21 ekspresyonuna rastlanmamıştır. Işınlanmış overlerdeki p53 ekspresyonu kontrol grubuna göre artmıştır. Kontrol grubu granüloza hücrelerinde zayıf eksprese edilen p21 teka hücrelerinde saptanmamıştır. Işınlamadan sonra p53 ve p21 mRNA ve protein beta aktine göre anlamlı derecede artmıştır (204).

Bulgularımızı yukarıda özetlenen çalışmalar ışığında değerlendirdiğimizde radyasyonun direkt oksidatif stres yaratıcı etkisi ile intrinsek apoptotik yolağı tetiklediği, bununla birlikte radyasyon maruziyeti ile artan oksidanların mitokondrial bütünlüğü bozarak steroidogenezi de olumsuz yönde etkilediği, böylece özellikle gelişimleri için steroidogeneze daha yüksek bağımlılık gösteren preantral ve daha ileri evre foliküllerde apoptotik süreci daha da hızlandırdığını düşünmekteyiz. Bununla birlikte devamlılıkları için steroidogeneze duydukları bağımlılık daha zayıf olan primordial foliküllerde shilajit'in yalnızca radyasyonla artan oksidatif stresi

azaltmasının bile primordial folikül sayısını anlamlı ölçüde arttırmaya yettiği düşüncesindeyiz. Yine radyasyon+shilajit grubundaki preantral ve daha ileri evre folikül morfolojisinin kısmen korunmuş ve apoptotik belirteç ekspresyonlarının bu grupta radyasyon grubuna göre zayıf olması bize bu foliküler evrelerde de shilajit'in daha yüksek dozlarda olumlu etki gösterebileceğini düşündürmüştür. Özellikle Takai ve ark.'nın çalışması (195) ışığında değerlendirildiğinde shilajit'in radyasyon+shilajit grubunda primordial folikül sayısındaki anlamlı farkın ve bu foliküllerdeki düşük Bax ekspresyonunun ortaya çıkmasına katkı sağladığını düşünmekteyiz. Yine özellikle Lee ve ark. (204) ve Said ve ark.'nın (184) çalışmaları ışığında değerlendirildiğinde shilajit verilen gruplardaki düşük p53, Bax ve kaspaz 3 ekspresyonlarını shilajit'in antioksidan özellikleri ile açıklamaktayız.

6. SONUÇLAR

1- Deneklerimizin ağırlıklarını deney süresi boyunca tarttık. Kontrol ve shilajit grupları arasında deneyin başlangıcında ağırlık ortalamaları açısından fark yok iken, sakrifikasyon günü shilajit grubu lehine anlamlı bir fark saptadık. Deneyin başlangıcında ağırlık ortalamaları birbirinden farklı olan radyasyon ve radyasyon+shilajit gruplarının ağırlıklarının yüzde değişimleri arasında ise fark bulamadık.

2- Folikül sayıları açısından değerlendirdiğimizde, shilajit grubu ile kontrol grubu arasında, radyasyon+shilajit grubu ile de radyasyon grubu arasında primordial folikül sayıları yönünden, shilajit verilen gruplarda sayı daha yüksek olacak şekilde anlamlı fark gözlemledik. Atretik folikül sayıları açısından değerlendirdiğimizde ise radyasyon verilen gruplar arasında fark bulamadık. Yine kontrol ve shilajit grupları arasında da anlamlı fark yoktu.

3- Oksidan-antioksidan dengeyi değerlendirmek için MDA ve TAK ölçümü yaptık. Gruplar arasında MDA ve TAK değerleri açısından fark bulamadık. Bununla birlikte radyasyon+shilajit grubunda TAK değeri radyasyon grubuna göre biraz daha yüksekti. Yine özellikle radyasyon+shilajit grubunda MDA'nın ortanca değerinin 4.38 mmol/L ile diğer gruplardan daha düşük olduğunu gözlemledik.

4- Gruplar arası histopatolojik değerlendirmede radyasyon grubunda ovaryum dokusundaki hasarın çok belirgin olduğunu, foliküllerin tamamına yakınının atretik görünüm arz ettiğini, istatistik sonuçlarımızla uyumlu şekilde primordiyal folliküllerin germinal epitel altında nadiren bulunduğunu gözlemledik. Radyasyon+shilajit grubunda ise doku hasarının biraz daha azaldığını, az da olsa normal görümlü primordial foliküllere rastlandığını ve ileri evre foliküllerin çoğu atreziye uğramış olsa da bunlardan bazılarının erken evre apoptotik değişiklikler sergilediğini gözlemledik.

5- Ovaryan foliküllerdeki apoptotik süreci değerlendirmek için p53, Bax ve kaspaz 3 ekspresyonlarını indirekt immunohistokimyasal yöntemle gösterdik. Kontrol ve shilajit gruplarındaki foliküllerin granüloza hücrelerinde her üç protein için düşük ekspresyon saptanırken radyasyon grubunda ekspresyonların çok arttığını

gözlemledik. Radyasyon+shilajit grubunda ise az sayıda da olsa ekspresyon göstermeyen primordial foliküller ile birlikte bazı preantral ve daha ileri evre foliküllerin nispeten düşük ekspresyon gösterdiklerini gözlemledik.

Bu çerçevede değerlendirildiğinde shilajit'in radyasyona bağlı gelişen doku hasarı ve oksidatif strese karşı etkili olduğu, toksik dozunun bizim deneyimizde verdiğimiz dozdan çok daha yüksek olduğu düşünüldüğünde, arttırılmış dozlarında shilajit'in antioksidan özelliklerinin daha çarpıcı bir şekilde ortaya çıkacağı kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

1. P Kaatsch. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treatment Reviews* 36(4):277-285, 2010.
2. LE Bath, W Hamish, B Wallace, HOD Critchley. Late effects of the treatment of childhood cancer on the female reproductive system and the potential for fertility preservation. *BJOG* 109(2):107-114, 2002.
3. RW Miller, JL Young and B Novakovic. Childhood cancer. *Cancer* 75(1): 395–405, 1995.
4. MM Hudson. Reproductive outcomes for survivors of childhood cancer. *Obstetrics and Gynecology* 116(5):1171–1183, 2010.
5. M Geenan, M Cardous-Ubbink, L Kremer et al. Medical assessment of adverse health outcomes in long-term survivors of childhood cancer. *JAMA* 297(24):2705–2715, 2007.
6. KC Oeffinger, AC Mertens, CA Sklar et al. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* vol. 355(15):1572–1582, 2006.
7. Baird DT, Mitchell A. Hormonal control in folliculogenesis: The to Successful reproduction. Ed: Eppig J, Hegele-Hartung Ch, Lessl M, *The Future of the Oocyte*. pp. 1-7, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, 2002.
8. Simon B, Lee J, Partridge A, Runowicz C. Preserving fertility after cancer. *CA Cancer J Clin*, 55(4):211-228, 2005.
9. RJ Johnston and WHB Wallace. Normal ovarian function and assessment of ovarian reserve in the survivor of childhood cancer. *Pediatr Blood Cancer* 53(2):296–302, 2009.

10. WHB Wallace, AB Thomson, F Saran and TW Kelsey. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62(3):738–744, 2005.
11. Özalpan A. *Temel Radyobioloji*. 1. Basım, s.218, Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 2001.
12. I Adriaens, J Smits, P Jacquet. The current knowledge on radiosensitivity of ovarian follicle development stages. *Hum reprod Update* 15(3):359-377, 2009.
13. JK Kim, CJ Lee, KW Song, BR Do and YD Yoon. γ -Radiation accelerates follicular atresia in immature mice. *In Vivo* 13(1):21-4, 1999.
14. Hendry JH, West CM. Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response. *Int J Radiat Biol* 71(6):709–719, 1997.
15. Chapman RM. Effect of cytotoxic therapy on sexuality and gonadal function. *Semin Oncol* 9(1):84–94, 1982.
16. Ataya K, Pydyn E, Ramahi-Ataya Orton CG. Is radiation-induced ovarian failure in rhesus monkeys preventable by luteinizing hormone-releasing hormone agonists? preliminary observations. *J Clin Endocrinol Metab* 80(3): 790–795, 1995.
17. Chemaitilly W, Mertens AC, Mitby P, et al. Acute ovarian failure in the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Endocrinol Metab* 91(5):1723-1728, 2006.
18. Wallace WH, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patients with cancer: Who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol* 6(4):209-218, 2005.
19. Pouilles JM, Tremollieres F, Bonneau M, Ribot C. Influence of early age at menopause on vertebral bone mass. *J Bone and Miner Res* 9(3): 311 – 5, 1994.

20. Vega EM, Egea MA, Mautalen CA. Influence of menopausal age on the severity of osteoporosis in women with vertebral fractures. *Maturitas* 19(2):117 – 24, 1994.
21. De Kleijn MJJ, van der Schouw YT, Verbeek AL, Peeters PH, Banga J, van der Graaf Y. Endogenous estrogen exposure and cardiovascular mortality risk in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 155(4):339 – 45, 2002.
22. Schover L. Sexuality and body image in younger women treated for breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 16 : 177 – 82, 1997.
23. Brenner PF. The menopausal syndrome. *Obstet Gynecol* 72(5):68 – 118, 1998.
24. Arnon J, Meirow D, Lewis-Roness H, Ornoy A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 7(4):394–403, 2001.
25. R Stillman, J Schinfeld, I Schiff et al. Ovarian failure in long-term survivors of childhood malignancy. *Am J Obstet Gynecol* 139(1):62–66, 1981.
26. DM Green, T Kawashima, M Stovall et al. Fertility of female survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol* 27(16):2677–2685, 2009.
27. DM Green, CA Sklar, JD Boice et al. Ovarian failure and reproductive outcomes after childhood cancer treatment: results from the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol* 27(14):2374–2381, 2009.
28. Bakker B, Massa GG, Oostdijk W, Van Weel-Sipman MH, Vossen JM, Wit JM. Prepubertal development and growth after total-body irradiation and bone marrow transplantation for haematological malignancies. *Eur J Pediatr* 159(1-2):31-7, 2000.
29. Ogilvy-Stuart A, Shalet SM. Effect of radiation on the human reproductive system. *Environ Health Perspect Suppl* 101(2):109-16, 1993.

30. Nicosia SV, Matus-Ridley M, Meadows AT. Gonadal effects of cancer therapy in girls. *Cancer* 55(10):2364- 72, 1985.
31. MF M Mitwally. Fertility preservation and minimizing reproductive damage in cancer survivors. *Expert Rev Anticancer Ther* 7(7):989–1001, 2007.
32. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 10(3):251-266, 2004.
33. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 24(18):2917–2931, 2006.
34. Abedelahi A, Salehnia M, Allameh AA. The effects of different concentrations of sodium selenite on the in vitro maturation of preantral follicles in serum-free and serum supplemented media. *J Assist Reprod Genet* 25(9-10):483–488, 2008.
35. Morita Y et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nature Med* 6(10):1109–1114, 2000.
36. Cevat Aktas, Mehmet Kanter and Zafer Kocak, Antiapoptotic and proliferative activity of curcumin on ovarian follicles in mice exposed to whole body ionizing radiation, *Toxicol Ind Health* 28(9):852-863, 2012.
37. Simsek Y et al. Ameliorative Effects of Resveratrol on Acute Ovarian Toxicity Induced by Total Body Irradiation in Young Adult Rats. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 25(4):262-6, 2012.
38. Rajesh Khanna, Matthias Witt, Md. Khalid Anwer, Suraj P Agarwal, Boris P Koch. Spectroscopic characterization of fulvic acids extracted from the rock exudate shilajit. *Organic Geochemistry* 39(12):1719-1724, 2008.
39. Keith L Moore, TVN Persaud. Embriyoloji ve doğum defektlerinin temelleri (Çev. Ed: Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F) s.163-189, Güneş Tıp Kitapevi, Ankara, 2009.

40. Junqueira LC, Carneiro J, Temel Histoloji (Çev.Ed: Solakoğlu S, AytekinY) s.435-455, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2009.
41. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji (Çev. Ed: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P) s.399-425, Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, 2009.
42. Metin MS. Normal ve süperovüle farelerde iyonizan radyasyonun ovaryum morfolojisi, östrus siklusu ve ovülasyon oranı üzerine etkilerinin incelenmesi. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji Anabilim Dalı Histoloji Ve Embriyoloji Bilim Dalı, Doktora Tezi, Edirne, 2008.
43. Aktaş C, İyonizan radyasyonun neden olduğu ovaryan doku hasarına karşı curcumim'in koruyucu etkisinin morfolojik olarak incelenmesi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji Anabilim Dalı Histoloji Ve Embriyoloji Bilim Dalı, Doktora Tezi, Edirne, 2010.
44. Güler Ç. Çevre Sağlığı (Çevre ve ekoloji Bağlantılarıyla), 1. cilt, s.935-945, Yazıt Yayıncılık, Ankara, 2012.
45. <http://www.nrc.gov/reading-rm/basic-ref/teachers/09.pdf> , 2013.
46. Slupphaug G, Kavli B, Krokan H. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 531(1-2):231–251, 2003.
47. Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227(4685):375–380, 1985.
48. Chen YR, Wang X, Templeton D, Davis RJ, Tan TH. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and γ radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem* 271(50):31929–31936, 1996.
49. Cherupally K Nair, Dilip K Parida, Taisei Nomura. Radioprotectors in radiotherapy. *J Radiat Res* 42(1):21-37, 2001.

50. Edouard I Azzam, Jean-Paul Jay-Gerin, Debkumar Pain. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters* 327(1-2):48–60, 2012.
51. Chance B, Sies H, and Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59(3):527–605, 1979.
52. Patrick J Devine, Sally D Perreault, Ulrike Luderer. Roles of Reactive Oxygen Species And Antioxidants in Ovarian Toxicity. *Biol of reprod* 86(2):27, 2012.
53. Buttke TM, and Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15(1):7–10, 1994.
54. UNSCEAR. United nations scientific committee on the effects of atomic radiation, report to the general assembly, with scientific annexes. Volume II: Effects. United Nations sales publication E.00.IX.4. United Nations, New York, 2000.
55. Byskov AG. Follicular atresia. In: Jones, R. (Ed.), *The vertebrate Ovary*. pp. 533-562, Plenum, New York, 1978.
56. Baker TG. Comparative aspects of the effects of radiation during oogenesis. *Mutat Res* 11(1):9–22, 1971.
57. Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod* 63(5):1245-52, 2000.
58. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239-57, 1972.
59. Glücksmann A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol Reprod* 26(1):59-86, 1951.
60. Miller LJ and Marx J. Apoptosis. *Science* 281(5381):1301-1326, 1998.
61. Ellis HM, Horvitz R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44(6):817-829, 1986.

62. Yuan J, Horvitz R. The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Developmental Biol* 138(1):33-41, 1990.
63. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol* 138(5):482-491, 1998.
64. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326(1):1-16, 1997.
65. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87(2):171, 1996.
66. Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G, Dixit VM. Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem* 273(45):29648-53, 1998.
67. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403(6765):98-103, 2000.
68. Lavrik In, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115(10):2265-72, 2005.
69. Li H and Yuan J. Deciphering the pathways of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 11(2):261-266, 1999.
70. http://en.wikipedia.org/wiki/Death-inducing_signaling_complex (2013).
71. Li H, Zhu H, Xu CJ, and Yuan J. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94(4):491-501, 1998.
72. Esposti MD. The roles of Bid. *Apoptosis* 7(5):433-40, 2002.
73. Schuler M, and Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 29(6):684-8, 2001.

74. Wang XW and Harris CC. p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *J Cell Physiol* 173(2):247–55, 1997.
75. Ulukaya E. Hücre siklusu ve Apoptozis. Kayıhan Engin, Nihat Özyardımcı (Ed.). *Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide İlkeler ve Uygulamalar*. (Bölüm 3). İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık, 2001.
76. Vermeulen K, Berneman ZN, vanBockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* 36(3):165-75, 2003.
77. Harper J, Adami G, Wei N, et al. The p21 Cdk interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75(4):805-16, 1993.
78. Kearns WG, Liu JM. Cell cycle checkpoint genes and aneuploidy: A short review. *Current Genomics* 2(2):171-80, 2001.
79. Reifemberger G, Reifemberger J, Ichimura K, et al. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS and MDM2. *Cancer Res* 54(16):4299-303, 1994.
80. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, and Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9(6):1799–805, 1994.
81. Miyashita T, Harigai M, Hanada M and Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 54(12):3131–3135, 1994.
82. Pietsenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181–182:475–81, 2002.
83. Varley JM, Evans DG and Birch JM. Li-Fraumeni syndrome—a molecular and clinical review. *Br J Cancer* 76(1):1–14, 1997.

84. Gu J, Kawai H, Wiederschain D, Yuan ZM. Mechanism of functional inactivation of a Li-Fraumeni syndrome p53 that has a mutation outside of the DNA-binding domain. *Cancer Res* 61(4):1741–6, 2001.
85. Keren-Tal I, Suh B-S, Dantes A, Lindner S, Oren M and Amsterdam A. Involvement of p53 expression in cAMP-mediated apoptosis in immortalized granulosa cells. *Exp Cell Res* 218(1):283–295, 1995.
86. Tilly KI, Banerjee S, Banerjee PP and Tilly JL. Expression of the p53 and Wilms' tumor suppressor genes in the rat ovary: gonadotropin repression in vivo and immunohistochemical localization of nuclear p53 protein to apoptotic granulosa cells of atretic follicles. *Endocrinology* 136(4):1394–1402, 1995.
87. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat med* 3(6):614-620, 1997.
88. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng T-I, Jones DP and Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275(5303):1129-1132, 1997.
89. Mills JC, Stone NL and Pittman RN. Extranuclear apoptosis: the role of the cytoplasm in the execution phase. *J Cell Biol* 146(4):703-707, 1999.
90. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22(3): 355–70, 2005.
91. Locksley RM, Killeen N and Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104(4):487–501, 2001.
92. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL TWEAK. A new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 272(51):32401–10, 1997.
93. Ashkenazi A and Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281(5381):1305–8, 1998.

94. Hsu H, Xiong J and Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81(4):495–504, 1995.
95. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296(5573):1635–6, 2002.
96. Kataoka T, Schroter M, Hahne M, Schneider P, Irmeler M, Thome M, Froelich CJ, Tschopp J. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol* 161(8):3936–42, 1998.
97. Trapani JA and Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2(10):735–47, 2002.
98. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391(6662):96–9, 1998.
99. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2(6):401–9, 2002.
100. Lieberman J, Fan Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* 15(5):553–9, 2003.
101. Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1(1):5–15, 1999.
102. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192(4):571–80, 2000.
103. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410(6828):549–54, 2001.

104. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412(6842):95–9, 2001.
105. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kothe K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278(5336):294–8, 1997.
106. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2(4):277–88, 2002.
107. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272(42):26159–65, 1997.
108. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton D L. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 276:1071–7, 2001.
109. Svensson PA, Johnson MS, Ling C, Carlsson LM, Billig H and Carlsson B. Scavenger receptor class B type I in the rat ovary: possible role in high density lipoprotein cholesterol uptake and in the recognition of apoptotic granulosa cells. *Endocrinology* 140(6):2494–2500, 1999.
110. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 171(9):4672–9, 2003.
111. Emilia Markström, Eva Ch Svensson, Rujin Shao, Bodil Svanberg, Hakan Billig. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 123(1):23-30, 2002.

112. Tilly JL, Tilly KI. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 136:242-52, 1995.
113. Tilly JL, Bilhig H, Kowalski KI, Hsueh AJW. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* 6:1942-50, 1992.
114. Hsueh AJW, Bilhig B, Tsafn A. Ovarian follicle atresia a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 15(6):707-24, 1994.
115. Braw RH, Tsafiri A. Follicles explanted from pentobarbitone-treated rats provide a model for atresia. *J Reprod Fertil* 59(2): 259–265, 1980.
116. Roger Gosden, Norah spears. Programmed cell death in the reproductive system. *Br med bull* 52(3):644-661, 1997.
117. Ghosal S, Lal J, Singh SK, Goel RK, Jaiswal AK, Bhattacharya SK. The need for formulation of shilajit by its isolated active constituents. *Phytother Res* 5(5): 211-216, 1991.
118. Frolova LN, Kiseleva TL. Chemical composition of mumijo and methods for determining its authenticity and quality (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal* 30(8):543–547, 1996.
119. Al-Himaidi AR, Mohammed U. Safe use of salajeet during the pregnancy of Female mice. *Online Journal of Biological Science* 3(8):681–684, 2003.
120. Ghosal S. Chemistry of shilajit, an immunomodulatory rasayan. *Pure and Applied Chemistry* 62(7):1285-1288, 1990.
121. Eugene Wilson, G Victor Rajamanickam, G Prasad Dubey, Petra Klose, Frauke Musial, F Joyonto Saha, Thomas Rampp, Andreas Michalsen, Gustav J Dobos.

Review on shilajit used in traditional Indian medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 136(1):1-9, 2011.

122. Schepetkin IA, Khlebnikov AI, Kwon BS. Medical drugs from humus matter: focus on mumie. *Drug Development Research* 57(3):140-159, 2002.

123. Agarwal SP, Khanna R, Karmarkar R, Anwer MK, Khar RK. Shilajit: a review. *Phytother Res* 21(5):401-405, 2007.

124. Thiagarajan R, Sunderrajan A. Gunapadam Thathu Jeeva. Gunapadam Thathu Jeeva Vaguppu. Gunapadam Thathu Jeeva Vaguppu, fourth ed. Directorate of Indian Medicine and Homeopathy, Chennai, India, 1992.

125. Ghosal S, Lata S, Kumar Y, Gaur B, Misra N. Interaction of Shilajit with biogenic free radicals. *Indian J Chem* 34B(7):596-602, 1995.

126. Ghosal S. Free radicals, oxidative stress and antioxidant defense. *Phytomedica* 21:1-8, 2000.

127. Anuya Rege, Parikshit Juvekar, Archana Juvekar. In Vitro Antioxidant And Anti-Arthritic Activities Of Shilajit. *Int J Pharm Pharm Sci* 4(2):650-653, 2012.

128. Rahul V Mandlik, Sandya K Desai, Suresh R Naik. Antidiabetic activity of a polyherbal formulation (DRF/AY/5001). *Indian j exp biol* 46(8):599-606, 2008.

129. Dinesh Kumar Surapaneni, Sree Rama Shiva Shanker Adapa, Kumari Preeti, Gangineni Ravi Teja, Muruganandam Veeraragavan, Sairam Krishnamurthy. Shilajit attenuates behavioral symptoms of chronic fatigue syndrome by modulating the hypothalamic-pituitary- adrenal axis and mitochondrial bioenergetics in rats. *J Ethnopharmacol* 143(1):91-99, 2012.

130. Mohamed-I, Kotb El-Sayed, Hatem-K Amin and Ali-G Al-Kaf. Anti-Microbial, Anti-Oxidant and, Anti-Ulcerogenic Effects of Shilajit on Gastric Ulcer in Rats. *Am J Biochem Biotechnol* 8(1):26-39, 2012.

131. Pravenn Sharma, Jagrati Jha, V Shrinivas, LK Dwivedi, P Suresh and M Sinha. Shilajit: Evaluation Of Its Effects On Blood Chemistry Of Normal Human Subjects. *Anc Sci Life* 23(2):114-119, 2003.
132. B Vivek, E Wilson, SV Nithya Devi, C Velmurugan, M Kanan. Cardioprotective activity of shilajit in isoproterenol - induced myo-cardial infarction in rats: A biochemical and histopathological evaluation. *Int J Res Phytochem Pharmacol* 1(1):28-32, 2011.
133. Ghosh R, Kadam P, Kadam V. Antioxidant and hypolipidemic activity of Kumbhajatu in hypercholesterolemic rats. *Int J Ayurveda Res* 1(3):159-162, 2010.
134. T K Biswas, S Pandit, S Mondal, SK Biswas, U Jana, T Ghosh, P C Tripathi, PK Debnath, RG Auddy, B Auddy. Clinical evaluation of spermatogenic activity of processed shilajit in oligospermia. *Andrologia* 42(1):48-56, 2009.
135. Saxena N, Upendra DN, Raj SK, Arvind K, Chhavi S, Ram SC, Mona S. Modulation of oxidative and antioxidative status in diabetes by *Asphaltum panjabinum*. *Diabetes Care* 26(8):2469–2470, 2003.
136. Knoll J. Pharmacological basis of the therapeutic effect of (-)deprenyl in age-related neurological diseases. *Med Res Rev* 12(5):505–524, 1992.
137. Ghosal S, Singh SK, Kumar Y et al. Antiulcerogenic activity of fulvic acids and 4-methoxy-6-carbomethoxybiphenyl isolated from Shilajit. *Phytother Res* 2(4):187–191, 1988.
138. Goel RK, Bannerjee RS, Acharya SB. Anti-ulcerogenic and anti-inflammatory studies with Shilajit. *J Ethnopharmacol* 29(1):95–103, 1990.
139. Tiwari P, Ramarao P, Ghosal S. Effects of Shilajit on the development of tolerance to morphine in mice. *Phytother Res* 15(2):177–179, 2001.

140. Jankovic BD. Neural tissue hypersensitivity in psychiatric disorders with Immunologic features. *J Immunol* 135(2):853–857, 1985.
141. Gupta GD, Sujatha N, Dhanik A, Rai NP. Clinical evaluation of Shilajatu Rasayana in patients with HIV infection. *Ayu Journal* 31(1):28–32, 2010.
142. Bhattacharya SK. Shilajit attenuates streptozocin induced diabetes mellitus and decrease in pancreatic islet superoxide dismutase activity in rats. *Phytother Res* 9(1):41–44, 1995.
143. NA Trivedi, B Mazumdar, JD Bhatt, KG Hemavathi. Effect of shilajit on blood glucose and lipid profile in alloxan-induced diabetic rats. *Indian j pharmacol* 36(6):373-376, 2004.
144. Ghosal S, Lal J, Singh SK et al. Mast cell protecting effects of Shilajit and its constituents. *Phytother Res* 3(6):249–252, 1989.
145. Jaiswal AK, Bhattacharya SK. Effects of Shilajit on memory, anxiety and brain monoamines in rats. *Indian J Pharmacol* 24(1):12–17, 1992.
146. Ghosal S, Lal J, Jaiswal AK, Bhattacharya SK. Effects of Shilajit and its active constituents on learning and memory in rats. *Phytother Res* 7(1):29–34, 1993.
147. Jeong-Soog Park, Gee-Young Kim, Kun Han. The spermatogenic and ovogenic effects of chronically administered shilajit to rats. *J Ethnopharmacol* 107(3):349-353, 2006.
148. Devine PJ, Sipes IG, Hoyer PB. Initiation of delayed ovotoxicity by in vitro and in vivo exposures of rat ovaries to 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod Toxicol* 19(1):71-7, 2004.
149. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 16(2):359–364, 1966.

150. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38(12):1103-11, 2005.
151. AN Hirshfield, AR Midgley Jr. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod* 19(3):597–605, 1978.
152. Taylor AE, Schneyer AL and Sluss PM. The ovary: ovarian failure, resistance, and activation. In *The Ovary* Adashi EY and Leung PCK (eds). New York: Raven Press 629–661, 1993.
153. Jacquet P, de Saint-Georges L, Buset J et al. Cytogenetic effects of X-rays in the guinea pig female germ cells: II. The maturing oocyte. *Mutat Res* 391(3):193–199, 1997.
154. Ray S, Behari J. Physiological changes in rats after exposure to low levels of microwaves. *Radiat Res* 123: 199-202, 1990
155. Mole RH, Papworth DG. The sensitivity of rat oocytes to X-rays. *Int Radiat Biol* 6(10):609–15, 1996.
156. Young-Keun Lee, Hwa-Hyoung Chang, Won-Rok Kim, Jin Kyu Kim, Yong-Dal Yoon. Effects of gamma radiation on ovarian follicles. *Arh Hih Rada Toksikol* 49(2):147-153, 1998.
157. Lee CJ, Park HH, Do BR, Yoon YD, Kim JK. Natural and radiation induced degeneration of primordial and primary follicle in Mouse ovary. *Anim reprod sci* 59(1-2):109-117, 2000.
158. JF Kerr, CM Winterford, BV Harmon. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73(8):2013–2026, 1994.
159. Chang Joo Lee, Yong Dal-Yoon. Gamma radiation induced follicular degeneration in the prepubertal Mouse ovary. *Mutat res* 578(1-2):247-255, 2005.

160. Velmurugen C, Vivek B, Wilson E, Bharathi T, Sundaram T. Evaluation of safety profile of black shilajit after 91 days repeated administration in rats. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(3):210-214, 2012.
161. TSUOA, H. On the fine structure of the atretic follicles of mouse ovary, especially on the patterns of endoplasmic reticulum observed in the early meiotic prophase. *Acta Anat Nippon* 40: 40-41, 1965.
162. Nishida T. Study on morphological changes of ovaries in mice exposed to ⁶⁰Co gamma ray irradiation. *Kurume Med J* 27(3):197-207,1980.
163. Aktaş C, Kanter M, Kocak Z. Antiapoptotik and proliferative activity of curcumin on ovarian follicles in mice exposed to whole body ionizing radiation. *Toxicol ind health* 28(9):852-63, 2012.
164. Mikkelsen RB, and Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22(37):5734–5754, 2003.
165. Ewing D, and Jones SR. Superoxide removal and radiation protection in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 254(1):53–62, 1987.
166. Said TM, Agarwal A, Sharma RK. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stres. *Fertil steril* 83(1):95-103, 2005.
167. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil steril* 79(4):829-43, 2003.
168. Hirofumi Henmi, Toshiaki Endo, Yoshimitsu Kitajima, Kengo Manase et al. Effects of ascorbic acid supplementation on serum progesterone levels in patients with a luteal phase defect. *Fertil steril* 80(2):459-461, 2003.
169. Abedelahi A, Salehnia M, Allameh AA. The effects of different concentrations of sodium selenite on the in vitro maturation of preantral follicles in serum-free and serum supplemented media. *J Assist Reprod Genet* 25(9-10):483–488, 2008.

170. Shiotani M, Noda Y, Narimoto K et al. Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the human ovary. *Hum Reprod* 6(10):1349–1353, 1991.
171. Ishikawa M, Tamate K, Nakata T, Sengoku K, Suzuki K, Taniguchi N. Superoxide dismutase/corpus luteum: immunohistochemical localization of Cu, Zn and Mn superoxide anion in ovulation/luteal function. *ARTA* 4: 251–259, 1993.
172. Suzuki T, Sasano H, Takaya R et al. Leukocytes in normal cycling human ovaries: immunohistochemical distribution and characterization. *Hum Reprod* 13(8):2186–2191, 1998.
173. Suzuki T, Sugino N, Fukaya T et al. Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization. *Fertil Steril* 72(4):720–726, 1999.
174. Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1(3):162-172, 1996.
175. Palumbo A, Yeh JY. Apoptosis as a basic mechanism in the ovarian cycle: follicular atresia and luteal regression. *J Soc Gynecol Invest* 2(3):565-573, 1995.
176. Lazarides E, Lindberg U. Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I. *Proc Natl Acad Sci USA* 71(12):4742-4746, 1974.
177. Tanaka Y, Yoshihara K, Itaya A, Kamiya T, Koide SS. Mechanism of the inhibition of Ca^{+2} - Mg^{+2} -dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP ribosylation. *J Biol Chem* 259(10):6579-6585, 1984.
178. David L Boone and Benjamin K Tsang. Caspase-3 in the Rat Ovary: Localization and Possible Role in Follicular Atresia and Luteal Regression. *Biol Reprod* 58(6):1533-1539, 1998.
179. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gasgoyne R, Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res* 57(8):1605-1613, 1997.

180. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *TIBS* 22(8):299-306, 1997.
181. Shinomiya N. New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'. *J Cell Mol Med* 5(3):240–253, 2001.
182. Feinendegen LE. Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents. *Hum Exp Toxicol* 21(2):85–90, 2002.
183. England K, Cotter TG. Direct oxidative modifications of signalling proteins in mammalian cells and their effects on apoptosis. *Redox Rep* 10(5):237–245, 2005.
184. Riham S. Said, Ahmed S. Nada, Ebtehal El-Demerdash. Sodium Selenite Improves Folliculogenesis in Radiation-Induced Ovarian Failure: A Mechanistic Approach. *PLoS ONE* 7(12): e50928, 2012.
185. Koshland DE, Jr Walsh K and LaPorte, DC *Curr. Sensitivity of metabolic fluxes to covalent control. Top Cell Regul* 27, 13–22, 1985.
186. Chae HZ, Chung SJ and Rhee SG. Thioredoxin dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 269(44):27670–27678, 1994.
187. Kwon SJ, Park JW, Choi WK, Kim IH and Kim K. Inhibition of metal catalyzed oxidation systems by a yeast protector protein in the presence of thioredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 201(1):8–15, 1994.
188. Jin Hyup Lee, Sung Youl Kim, In Sup Kil, and Jeon-Woo Park, Regulation of Ionizing Radiation-induced Apoptosis by Mitochondrial NADP⁺-dependent Isocitrate Dehydrogenase. *Journal Biol Chem* 282(18):13385–13394, 2007.
189. Kaipa A, Hsueh AJW. Regulation of ovarian follicular atresia. *Annu Rev Physiol* 59:349-363, 1997.
190. Boone DL, Tsang BK. Identification and localization of DNase I in the rat ovary. *Biol Reprod* 57(4):813-821, 1997.

191. Amsterdam A, Selvaraj N. Control of differentiation, transformation, and apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. *Endocr Rev* 18(4):435–461, 1997.
192. Yacobi K, Wojtowicz A, Tsafirri A, Gross A. Gonadotropins enhance caspase-3 and -7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture. *Endocrinology* 145: 1943–1951, 2004.
193. Markstrom E, Svensson E, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 123(1):23–30, 2002.
194. MA Fenwick and PR Hurst. Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. *Reproduction* 124(5):659–665, 2002.
195. Yasushi Takai, Jacqueline Canning, Gloria I Perez, James K Pru, Jennifer J Schlezinger, David H Sherr, Richard N Kolesnick, Junying Yuan, Richard A Flavell, Stanley J Korsmeyer And Jonathan L Tilly. Bax, Caspase-2, and Caspase-3 Are Required for Ovarian Follicle Loss Caused by 4-Vinylcyclohexene Diepoxide Exposure of Female Mice in Vivo. *Endocrinology* 144(1):69–74, 2003.
196. Allan DJ. Radiation-induced apoptosis: its role in a MADCaT (mitosis-apoptosis-differentiation-calcium toxicity) scheme of cytotoxicity mechanisms. *Int J Radiat Biol* 62(2):145-152, 1992.
197. Takahashi A, Ahnishi K and Ohnishi T. Radiation response of p53 and WAF1 accumulation after chronic or acute irradiation. In: Yamada T, Mothersill C, Michael BD and Poten CS (eds.), *Biological Effects of Low Dose Radiation*, pp. 59-66. Elsevier Science BV, Amsterdam, 2000.
198. Fukasawa K, Wiener F, Vande Woude GF et al. Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. *Oncogene* 15(11):1295-1302, 1997.

199. Brady HJ, Salomons GS, Bobeldijk RC et al. T cells from baxalpha transgenic mice show accelerated apoptosis in response to stimuli but do not show restored DNA damage-induced cell death in the absence of p53 gene product. *EMBO J* 15(6):1221-1230, 1996.
200. Yong-Dal Yoon, Ji Hyang Kim, Kyoung Hee Lee and Jin Kyu Kim. Amifostine has an Inhibitory Effect on the Radiation-induced p53-branched Cascade in the Immature Mouse Ovary. *in vivo* 19(3):509-514, 2005.
201. El-Deiry WS, Harper JW, O'Conner PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wiman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1/CIP1 is induced upon p53-mediated growth arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54:1169-1174, 1994.
202. Murnane JP. Cell cycle regulation in response to DNA damage in mammalian cells: A historical perspective. *Cancer Metastasis Rev* 14(1):17-29, 1995.
203. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3):323-331, 1997.
204. Chang Joo Lee, Heung-Tae Kim, Kang Won Song, Sang Soo Kim, Ho Hyun Park, And Yong-Dal Yoon. Ovarian Expression of p53 and p21 Apoptosis Regulators in g-Irradiated Mice. *Mol Reprod Dev* 75(2):383-391, 2008.

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



20

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 10/10/2012
TOPLANTI NO : 2012/08

6- B.E.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2012-33-10/10 Protokol no'lu "Sıçan Ovaryan Foliküllerinde Radyasyona Bağlı Apoptozis Üzerine Shilajitin Etkileri" konulu çalışmasının BEÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul ilkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Z. Nur BANOĞLU
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

