

**T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İYONİZE RADYASYONA MARUZ KALAN
SIÇAN OVARYUMUNDA
PARP-1 EKSPRESYONU
VE
FOLLİKÜLOGENEZ ÜZERİNE
CURCUMİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

İBRAHİM PALA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Kanat GÜLLE

**ZONGULDAK
2013**

**T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İYONİZE RADYASYONA MARUZ KALAN
SIÇAN OVARYUMUNDA
PARP-1 EKSPRESYONU
VE
FOLLİKÜLOGENEZ ÜZERİNE
CURCUMİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

İBRAHİM PALA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Kanat GÜLLE

Bu Tez Çalışması Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Tarafından
Desteklenmiştir. (Proje No: 2012-42-00-02)

**ZONGULDAK
2013**

TEZ KABUL ve ONAY

“İyonize radyasyona maruz kalan sıçan ovaryumunda PARP-1 ekspresyonu ve follikülogenez üzerine curcuminin koruyucu etkisi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

15.08.2013

Başkan: Yrd. Doç. Dr. Kanat GÜLLE

Üye: Yrd. Doç. Dr. Meryem Akpolat FERAH

Üye: Yrd. Doç. Dr. Bilgehan AÇIKGÖZ

ONAY: Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

TARİH:

Doç. Dr. Gamze YURDAKAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak Histoloji ve Embriyoloji bilimini öğreten, tezimin hazırlanmasında büyük emeği olan danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Kanat GÜLLE başta olmak üzere, her zaman desteğini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Meryem Akpolat FERAH'a, tez çalışmalarımda katkıları olan Yrd. Doç. Dr. Bekir Hakan BAKKAL ve Yrd. Doç. Dr. Füzünan KÖKTÜRK'e, tez çalışmam her türlü konuda bana destek olan değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Mete KEÇECİ ve Araş. Gör. Dr. Fatma Zehra YÜCE'ye ve beraber başladığımız yüksek lisans eğitimini yine beraber tamamladığımız çok sevgili arkadaşım Bayram KAMAT'a ve eğitim yaşamım boyunca maddi manevi desteğini esirgemeyen sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İbrahim PALA

Ağustos, 2013, ZONGULDAK

ÖZET

İbrahim PALA. İyonize Radyasyona Maruz Kalan Sıçan Ovaryumunda PARP-1 Ekspresyonu ve Follikülogenez Üzerine Curcuminin Koruyucu Etkisi. Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2013.

Radyasyon ovaryumda folliküler atreziye sebep olan atretojenik uyarılardan biridir. Oksidatif strese karşı kuvvetli bir antioksidan madde olan curcuminin, radyasyon hasarına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir.

Çalışmamızda, iyonize radyasyonun folliküler atrezi üzerine etkilerini göstererek, oluşacak hasarlara karşı curcuminin koruyucu etkisinin olup olmadığını ve hücre çekirdeklerinde meydana gelen DNA hasarını tamir eden Poli (ADP-riboz) polimeraz-1 enziminin immünohistokimyasal boyama yöntemiyle gösterilmesi amaçlandı.

Çalışmamız için seçilen dişi sıçanlar toplam 4 gruba ayrıldı. Radyasyon hasarı oluşturmak amacıyla deney gruplarına tek doz tüm vücut 8.3 Gy iyonize radyasyon uygulandı. Curcumin ve radyasyon+curcumin grubu deneklere; ışınlamadan 7 gün önce başlayarak günde 100 mg/kg curcumin oral yoldan verildi. Işınlamadan sonraki 4. günde deneklerden anestezi altında ovaryum dokuları alınarak mikroskopik incelemeler yapıldı.

Ovaryum dokularının kesitlerini incelediğimizde, ışınlanmış gruptaki atretik özellik gösteren folliküller sayıca fazlaydı. Radyasyon ile ışınlanan curcumin tedavili grupta ise atretik follikül oranı radyasyon grubuna göre daha düşüktü. Curcumin ile tedavi edilen grupta, curcuminin radyasyona bağlı meydana gelen hasarları kısmen engellediği tespit edildi.

Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlarda, PARP-1'in özellikle ışınlanmış grupta, primordiyal follikülden sekonder folliküle kadar gelişimin farklı aşamalarındaki oosit çekirdeklerinde kuvvetli ve bazı granüloza hücrelerinde zayıf bir boyanma gösterdiğini tespit ettik.

Çalışmamızda, radyasyonun ovaryum morfolojisi üzerine zararlı etkileri ortaya konmuş ve curcumin kullanımının radyasyona bağlı infertiliteyi engelleyerek kliniğe fayda sağlayabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: İyonize-radyasyon, Curcumin, PARP-1, Follikülogenez, Sıçan.

ABSTRACT

Ibrahim PALA. Protective Effect of Curcumin on Folliculogenesis, and PARP-1 Expression Exposed Ionising Radiation In Rat Ovary. Bulent Ecevit University, Enstitute of Health Science, Department of Histology and Embryology, Master of Science Thesis, Zonguldak, 2013.

Radiation is known to be one of the agents intensifying follicular atresia in the ovarium as a stimulant of atretogenic. Curcumin is discussed to have a positive impact on radiation-induced damage. It has a strong antioxidant agent against oxidative stress.

The aim of our study was to show the effects of ionising radiation on ovarium follicular atresia so that the protective effect of curcumin on the resulting damage could be determined, and in addition to immunohistochemically determining to level of expression of PARP-1 enzyme is responsible for DNA repair in the nucleus of the cells protected from radiation or irradiated the cells.

The female rats were divided into 4 groups. The whole body of the rats in the experimental groups were exposed to a single dosage of ionising radiation (8.3 Gy) with a view to causing radiation-induced damage. The animals in the curcumin and in the irradiated with treated curcumin had been fed a daily 100 mg/kg of curcumin for seven days in a row before the radiation process was launched. Ovarium tissues sample were collected for the microscopic examinations.

The ovarium tissues showed that there were the number of follicles showing atresic features was significantly high in the irradiated group. On the other hand, in the irradiated with treated curcumin group showed that the number of atretic follicles was lower than that in the irradiated group. The irradiated group given curcumin were observed to prevent the follicular damage caused by radiation.

Beside our results demonstrate that PARP-1 especially was expressed in the nuclei of oocytes throughout follicular development from the primordial to the secondary follicle stages and some in granulosa cells.

It was identified that effects of radiation on ovarian morphology and was speculated that curcumin may help prevent infertility caused by radiation and thus be of benefit to clinical practice.

Keywords: Ionizing-radiation, Curcumin, PARP-1, Folliculogenesis, Rat.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Tez kabul ve onay	iii
Önsöz	iv
Özet	v
Abstract	vi
İçindekiler	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Tablo dizini	xi
Şekil dizini	xii
1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	4
2.1. Radyasyon ve Radyoaktivite	4
2.2. Radyasyonun Yaşamımızdaki Yeri ve Tıbbi Uygulamaları	5
2.3. Radyasyonun Biyolojik Etkileri	6
2.4. Biyolojik Doz Birim	7
2.5. Radyasyonun Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri	8
2.6. Ovaryum Histolojisi	9
2.6.1. Ovaryum Korteksi	10
2.6.2. Ovaryum Folliküllerinin Gelişimi (Folikülogenezis)	10
2.6.2.1. Primordiyal Follikül	11
2.6.2.2. Primer Follikül	11
2.6.2.3. Sekonder Follikül	12
2.6.2.4. Preovulatuvar Folliküller (Graaf Follikülleri)	14
2.6.2.5. Atretik Follikül	14
2.7. Ovulasyon	15
2.8. Korpus Luteum	15
2.9. Ovaryum Medullası	16
2.10. Oositin Gelişimi (Oogenezis)	17
2.11. Curcumin	17
2.11.1. Curcumin Kimyası	18
2.11.2. Curcumin Biyosentezi	19
2.11.3. Curcuminin Antioksidan Özellikleri	19

2.11.4. Curcuminin Radyoprotektif Etkileri	20
2.12. PARP.....	21
2.12.1. Poli (ADP-riboz)	21
2.12.2. PARP-1 Proteininin Yapısı ve Fonksiyonu	21
2.12.3. Poli(ADP-Riboz)ilasyonun Oksidatif Stres İle Olan İlişkisi	23
3. Gereç ve Yöntemler	24
3.1. Işık Mikroskopik İncelemeler	25
3.2. İmmünohistokimyasal İncelemeler	26
3.3. İstatistiksel Analiz.....	27
4. Bulgular.....	28
4.1. Kontrol Grubuna Ait Mikroskopi Bulguları	28
4.2. Curcumin Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular	29
4.3. Radyasyon Grubuna Ait Mikroskopi Bulguları	29
4.4. Radyasyon+Curcumin Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular	30
4.5. Kontrol Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular	34
4.6. Curcumin Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular	34
4.7. Radyasyon Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular	35
4.8. Radyasyon+Curcumin Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular	35
4.9. Deneklerin Total Vücut Ağırlığında ve Ovaryum Ağırlığında Meydana Gelen Değişiklikler.....	37
5. Tartışma.....	38
6. Sonuçlar	51
7. Kaynaklar	52
8. Ekler	60
Ek.1. Türkçe Etik Kurul Onayı	60
Ek.2. İngilizce Etik Kurul Onayı.....	61
9. Özgeçmiş.....	62

SİMGELER ve KISALTMALAR

AP	Apürinik/Apirimidinik
APE	Apürinik/Apirimidinik Endonükleaz
BER	Baz Çıkarım Onarımı
CAT	Katalaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GST	Glutasyon Transferaz
GSHpx	Glutasyon Peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
H ⁺	Hidrojen Radikali
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin Hormon
H+E	Hematoksilen + Eozin
LH	Luteinleştirici Hormon
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NO ⁻	Nitrik Oksit
OH ⁻	Hidroksil Radikali
OOH ⁻	Hidroksiperoksil Radikali
O ₂ ⁻	Süperoksit Radikal
PAR	Poli (ADP-riboz)
PARilasyon	Poli (ADP-riboz)ilasyon
PARG	Poli (ADP-riboz)glikohidrolaz
PARP	Poli (ADP-riboz)polimeraz
PARP-1	Poli (ADP-riboz)polimeraz-1
PARPs	Poli (ADP-riboz)polimerazlar
PAS + HL	Periyodik Asit Schiff Baz + Hemalen
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
ROT	Reaktif Oksijen Türler
RPC	Replikasyon Protein C
SOD	Süperoksit Dismutaz
SSBR	Tek Zincir Kırık Onarımı
XRCC1	X- Ray Cross Complementing Enzyme
ZP	Zona Pellusida

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Gy	Gray
nm	Nanometre
μm	Mikrometre
Sv	Sievert
BEÜ	Bülent Ecevit Üniversitesi

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1. Deney Grupları.....	25
2. Ovaryum Kesitlerindeki Folliküllerin Sınıflandırılması	26
3. Tüm gruplara ait farklı gelişim aşamasındaki sağlıklı ve atretik follikül sayılarının değerlendirilmesi.....	34
4. PARP-1 immünoreaktivitesi için histolojik skor değerleri.....	35
5. Deney süresince total vücut ağırlığında ve ovaryum ağırlığında gözlenen değişiklikler.....	37

ŞEKİL DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. İyonize radyasyon ve iyonize olmayan radyasyonun etki alanları.....	4
2. Ovaryum dokusunun hematoksilen-eozin ile boyanmış kesiti..	10
3. Primordiyal ve primer folliküller	11
4. Sekonder (antral) bir follikülde oosit, ZP ve granüloza hücreleri.....	13
5. Olgun bir follikül (Graaf follikülü).....	14
6. Curcuminin molekül yapısı.....	18
7. PARP-1 proteininin yapısı	22
8. Tüm gruplara ait ovaryum kesitlerinin görüntüsü.....	31
9. Tüm gruplara ait ovaryum kesitleri.....	32
10. Tüm Gruplara ait ovaryum kesitlerin PAS+HL boyaması.....	33
11. Sıçan ovaryum dokusunda PARP-1 ifadesinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi..	36

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde radyasyondan izole yaşamak artık mümkün olmamaktadır (1). Dünyadaki bütün canlılar iyonize ve iyonize olmayan radyasyonun etkisine maruz kalmaktadırlar (2). Maruz kalınan radyasyonun tespiti; (toplam doz, fraksiyon sayısı ve süre) farklı dokular ve organlar arasında değişiklik gösterir ve dokular üzerinde oluşan radyobiyojik etkinin anlaşılmasında önemli bir rol oynar (3).

İyonize radyasyonların biyolojik etkileri, radyasyonun doku içinden geçerken, dokuyu oluşturan veya dokuda bulunan atomların uyarılması, iyonlaşması veya moleküler yapıların bozulması sonucu ortaya çıkan etkilerdir. Radyasyonun biyolojik açıdan iki tür etkisi bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla somatik ve genetik etkilerdir. Somatik etkiler, radyasyondan etkilenen kişi veya kişilerin bizzat kendisinde oluşan etkilerdir. Genetik etkiler ise radyasyondan etkilenen kişi veya kişilerde değil de daha sonraki nesillerinde ortaya çıkan etkilerdir. Radyasyonlarla etkileşmelerde etkileşim süreleri dikkate alındığında ise iki tür radyasyon etkisinden söz etmek mümkündür. Bunlar sırasıyla radyasyonun akut etkisi ve kronik etkisidir. Tüm vücudun veya büyük bir bölümünün yüksek dozlarda radyasyona maruz kalması sonucu ortaya çıkan etkiler radyasyonun akut veya ani etkisi olarak adlandırılır. Kronik etki ise radyasyon etkileşmelerinin canlı sistemlerde oluşturabileceği olası zararlarının geç ortaya çıktığı durumları ifade eder. Bu etkiler genellikle birkaç yıllık bir kuluçka döneminden sonra ortaya çıkan etkilerdir (4).

Her hücre tipinin radyasyona duyarlılığı farklıdır. Sık bölünen ve farklılaşmamış olan over ve testisin germinal hücreleri, hematopoetik sistem hücreleri, gastrointestinal sistem epitel hücrelerin duyarlılığı fazla iken, bölünmeyen ve farklılaşmış hücrelerden; karaciğer, böbrek, kıkırdak, kas, sinir hücrelerinin duyarlılığı daha azdır (1).

Radyasyona karşı duyarlılığı fazla olan ve üreme sistemi içinde önemli yer tutan ovaryumların temel işlevi sağlıklı nesillerin sürdürülmesi için olgun oositlerin üretilmesini sağlamaktır. Bunun yanı sıra ovaryumlar dişilerde cinsel olgunluk ve üreme yeteneği için gerekli olan endokrin işlevlerini de yerine getirirler (5).

Kanser tedavi yöntemlerinden olan radyoterapi, ovaryum follikül havuzundaki primordiyal folliküllerin sayısını azaltıcı ve yok edici etki göstererek ovaryum yaşlanmasını hızlandırıcı bir etken olarak tanımlanmaktadır (6,7). Ovaryumdaki folliküllerin kuvvetli derecede yıkıma uğraması ovaryum işlevlerini

etkilemekte ve kalıcı ovaryum yetmezliğine neden olmaktadır (8). Bu nedenle radyoterapi sonrasında normal görünen genç bayanlar ilerleyen yıllarda prematüre ovaryum yetmezliği riski taşımaktadırlar. Radyoterapi sonrası görülen infertilite çok sayıda kanser hastasının maruz kaldığı bir durumdur (9).

Radyoterapinin ovaryum işlevleri üzerindeki toksik etkilerinin azaltılması için yeni yöntemler ve alternatif tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Özellikle tedavi sırasında önerilen ve bitkisel gıdalarda bulunan antioksidanlar ve anti-kanserojenler, kanser riskinin ve kanserden sonra gelişen travmanın azaltılmasında son derece etkili olan maddelerdir.

Curcumin, Çin ve Hindistan'da yaygın olarak yetiştirilen, *Zingiberaceae* familyasına ait, sarıçiçekli ve büyük yapraklı *Curcuma longa* bitkisinin rizomlarından elde edilir.

Curcumin aktive olmuş makrofajlardan salınan nitrik oksit (NO), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit (O_2^-) radikallerini süpüren etkili bir antioksidandır. Serbest radikalleri tutma özelliğinden dolayı Deoksiribonükleik Asit (DNA)'i oksidatif hasarlardan korur. Radyasyona karşı koruyucu etkisi, antioksidan özelliğinden kaynaklanmaktadır (10).

Radyoterapi esnasında veya sonrasında iyonize radyasyon doku hücrelerinde ya doğrudan DNA zincirinde kırılmalar oluşturur ya da hücre içindeki moleküllerle etkileşerek oksijen radikallerinin oluşumunu sağlar ve bu oksijen radikalleri DNA bileşenleri ile etkileşerek baz hasarı, tek ve çift zincir kırılmalarına ve diğer tip bozulmalara yol açarlar (1).

Poli ADP riboz polimeraz-1 (PARP-1) enzimi, her bir üyesinin enzimatik domainlerinin içinde 50 amino asit dizisinden oluşan PARP enzim ailesinin bir üyesidir. PARP-1, DNA hasar tamiri ve kromatin yapının bir görüntüleyicisidir. PARP-1, DNA hasar tamiri ve / veya gen transkripsiyonunda yer alan hücrel mekanizmada belirli DNA dizilerini ortaya çıkaran faktörlerle ilişkili birkaç kromozom ve nükleozomlar ve poli (ADP-riboz)illeri bağlar (11). Apoptozis ve DNA hasarına karşı çoklu hücrel yanıt oluşturur ve transkripsiyonu başlatır (12).

Yapılan çalışmalarda, follikülogenez ve oogenez süresince, poli ADP-riboz (PAR) ve PARP-1 önemli ifade kalıpları olduğu ve poli (ADP-riboz) ilasyon (PARilasyon)'un ovaryumda önemli bir rol oynadığı ortaya konulmuştur. Primordiyal follikülden sekonder follikül aşamalarına doğrudan folliküler gelişimde oositlerin çekirdeklerinde PARP-1 ifade olmuştur. Granüloza hücrelerindeki PAR

ifadesinin aksine; PARP-1, post primer follikül fazlarda gelişen oositi çevreleyen granüloza hücrelerinin büyük kısımlarında gösterilmiştir (13).

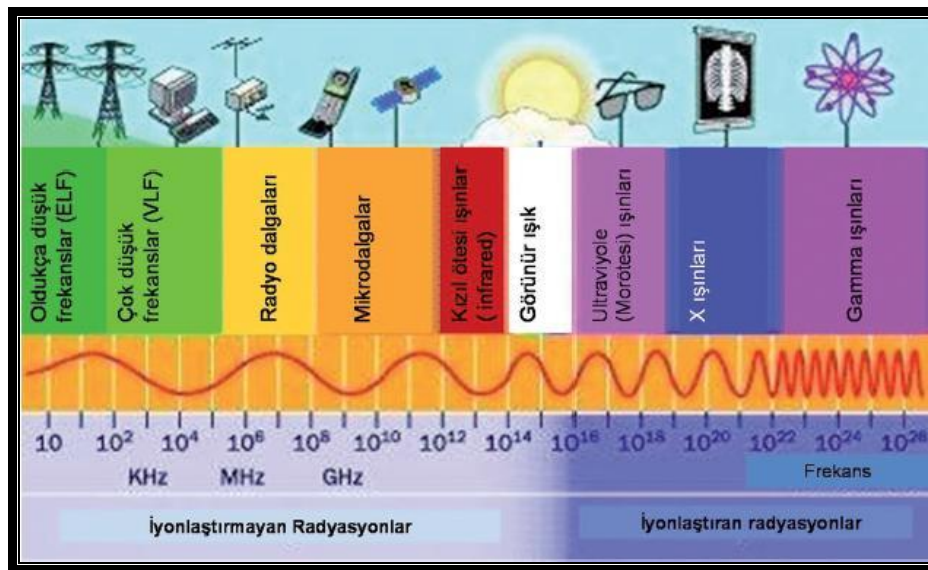
Çalışmamızda, özellikle ergenlik evresinde alınan radyoterapi tedavilerinin, bireylerin üreme işlevleri üzerinde oluşturabileceği zararlı etkilerin önlenmesi düşüncesiyle, uygulanan antioksidan karakterli curcuminin, ovaryumlar üzerine iyileştirici etkisinin olup olmadığının incelenmesi amaçlandı.

Bu çalışmada genç dişi sıçanlar tüm vücut iyonize radyasyona maruz bırakıldı. Işınlama uygulaması sırasında verilen antioksidan karakterli curcuminin, iyonize radyasyona maruz kalan, kanserli olmayan normal dokulara verdiği hasarı ne ölçüde azaltacağı histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle incelendi. Bulgular literatür verileriyle karşılaştırmalı olarak ortaya konulmaya çalışıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Radyasyon ve Radyoaktivite

Doğal ya da yapay radyoaktif çekirdeklerin kararlı yapıya geçebilmek için dışarı saldıkları hızlı parçacıklar ve elektromanyetik dalga şeklinde taşınan fazla enerjiler radyasyon olarak adlandırılır. Radyasyon, daima doğada var olan ve birlikte yaşadığımız bir olgudur. Işık, gözle görebildiğimiz bir radyasyon olup, elektromanyetik spektrumun yaklaşık 400-700 nanometre (nm)'lik bir kısmıdır. Diğer yandan ısı hissettiğimiz bir radyasyondur. Mikrodalga ve X ışınlarını ise ne görebildiğimiz ne de hissedebildiğimiz radyasyon tipidir (14,15). Radyasyon, iyonize ve iyonize olmayan radyasyon olarak iki gruba ayrılır. İyonize radyasyonlar, bir atom ya da molekülden bir elektron kopararak iyonlaşmaya yol açarlar. Kütleli yapıya sahip partiküler radyasyon ve foton enerjili dalga karakterinde elektromanyetik radyasyon olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Alfa (α) ve beta (β) parçacıkları, elektron, proton ve nötronlar partiküler iyonize radyasyon tiplerini oluşturur. X ve gama (γ) ışınları ise, iyonlaştırıcı yeteneğe sahip yüksek enerjili fotonlardan oluşan elektromanyetik radyasyonlardır (Şekil 1). Bunlar özellikleri açısından büyük oranda birbirlerine benzerler, ancak meydana geliş şekilleri farklıdır. X ışınları çekirdek dışında oluşan elektron kaynaklı ışınlardır, γ ışınları ise, radyoaktif bir çekirdeğin kararlı hale geçmesi esnasında parçalanarak açığa çıkan fazla enerjinin, çekirdekten dışarı atılması sonucunda oluşur (14,16).



Şekil 1. İyonize radyasyon ve iyonize olmayan radyasyonun etki alanları (4).

İyonize radyasyonların canlılarda biyolojik bir etkiye yol açabilmesi için sahip oldukları enerjinin, canlıyı oluşturan hücre ve dokular tarafından absorbe edilmesi ve dokularda dağılması gerekir. İyonlaştırıcı radyasyonların canlıda oluşturduğu etkileri üç basamakta sıralamak mümkündür.

İyonize radyasyon enerjisinin canlı dokuya transferi sonucunda, dokuyu oluşturan atom ve moleküllerde meydana gelen iyonlaşma ve uyarılma, radyasyon etkisinin ilk kademesi olan fiziksel kademeyi oluşturur. Bunu izleyen kimyasal kademede, hasar görmüş atom ve moleküller diğer hücrenel yapılar ile reaksiyona girerek serbest radikallerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Organizmada radyasyonun etkisi ile oluşan bu tür moleküler değişiklikler, son kademe olan biyolojik kademeyi başlatır.

Bu kademede çeşitli hasarlara yol açan enzimatik reaksiyonlar meydana gelir. İyonize radyasyon, hücre içi moleküllerde ve daha önemlisi genetik materyal olan kromozomlarda hasarlar oluşturur. Mutasyon olarak bilinen bu genetik hasarlar hücre tarafından tamir edilemez ise, hücreyi ölüme götüren süreci başlatan metabolik değişiklikler meydana gelir. Bu etki nedeniyle, iyonize radyasyonlar sürekli hücre çoğalması ile kendini gösteren kanser hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (14,17).

Radyasyon kaynaklarını; doğal radyasyon kaynakları ve yapay radyasyon kaynakları olarak sınıflayabiliriz. Doğal radyasyon kaynakları dış ve iç kaynaklardan gelebilir. Dış kaynaklar, uzaydan yeryüzüne gelen kozmik ışınlar ve γ radyasyondur. İç kaynaklar su, yemek ve hava yolu ile alınan radyo çekirdeklerden gelir (18).

2.2. Radyasyonun Yaşamımızdaki Yeri ve Tıbbi Uygulamaları

Son elli yıl içerisinde radyasyondan faydalanılarak yapılan çalışmalar yaşam standartlarımızın gelişmesine önemli katkılarda bulunmuştur. Radyasyon endüstriyel uygulamalarda, gıda ve tarım uygulamalarında, tüketici ürünlerinde, jeofizik, jeokimya ve özellikle tıp alanında teşhis ve tedavi uygulamalarında kullanılmaktadır.

Tıbbi alandaki radyasyon uygulamaları, radyasyonla görüntü elde edebilme ve radyasyonun hücre ve tümörleri yok edebilme yeteneğine sahip olması temeline dayanır. Bu iki özelliğinden dolayı radyasyon hastalıkların teşhis ve tedavisinde önemli rol oynar. Radyasyonun tıbbi alanda halen kullanılmakta olan ve gün geçtikçe geliştirilen en eski çeşidi X ışınlarıdır. Hastalıkların teşhisi

amacıyla kullanılan X ışınları, hasta X ışınlarına maruz bırakılarak hastalıklı bölgenin görüntüsü röntgen filmi olarak da adlandırılan radyografi filmi şeklinde elde edilir. Tıpta 'Radyoloji' olarak adlandırılan bu yöntem hastalıkların tanısında yaygın olarak kullanılmakta ve her yıl milyonlarca kişi X ışınları ile muayene edilmektedir (18).

2.3. Radyasyonun Biyolojik Etkileri

Radyasyonun insan sağlığı üzerinde meydana getirebileceği zararlı etkiler uzun zamandır bilinmektedir. Bu etkiler radyasyon yanıkları, radyasyon hastalıkları, yaşam süresinin kısalması, kanser, kalıtsal bozukluklar ve infertilitedir. Tıbbi ve endüstriyel uygulamalardan Hiroşima ve Nagazaki'ye atılan atom bombalarından maruz kalınan radyasyonun etkileri aralıksız bir şekilde araştırılmaktadır. Bu çalışmaların yanı sıra denek olarak kullanılan hayvanlar üzerinde de araştırmalar yapılmaktadır (14,18).

Radyasyonun canlılar üzerindeki biyolojik etkilerini, doğrudan ve dolaylı olarak ikiye ayırmak mümkündür (19).

Radyasyonun doğrudan etkisi: Bir canlıda radyasyon etkisi ile başlayan olayların, DNA molekülü veya bir enzim molekülü gibi özel bir biyolojik yapıyı doğrudan etkilemesi ile başlamasıdır. Radyasyon enerjisini doğrudan biyolojik bir moleküle transfer etmektedir.

Radyasyonun dolaylı etkisi: Radyasyon, enerjisini içinden geçtiği ortamın moleküllerine transfer etmişse radyasyonun dolaylı etkisi söz konusu olur. Canlı organizmaların yaklaşık olarak %70-90'ı sudan ibaret olduğu için en çok su moleküllerinin etkilenmesi ve bunun sonucunda vücut için oldukça zehirli olan hidroksil radikalleri (OH⁻) ve hidrojen radikalleri (H⁺) oluşması beklenir. Bunların birbirleriyle ve biyolojik moleküllerle etkileşmeleri sonucunda yine çok zehirli H₂O₂ molekülleri oluşabilir.

Canlı organizmaların temel yapısı hücrelerdir ve hücre çekirdeğinin içinde genetik bilgileri barındıran DNA, hücrenin bölünmesinden ve protein sentezinden sorumludur. Işınlanmış hücrelerde esas hedefin DNA olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle hücre bölünmesi sırasında hücre radyasyona karşı en duyarlı evrededir. Bu olayda, mitoz bölünme ile çoğalma sırasında DNA'nın iki katına çıkması ve radyasyonlar için daha fazla ışınlanacak bölge oluşturmasının payı olduğu kabul

edilmektedir. Radyasyon etkisi ile DNA'da tek kolda, çift kolda kırıklar, baz hasarları, baz kayıpları, denatürasyonlar ve çapraz baz eşleşmeleri oluşabilir (20).

Zincir kırılmaları DNA molekülünde meydana gelen en önemli hasar grubunu oluşturur. Bu hasarlar, tek zincir kırılmaları ve çift zincir kırılmaları şeklinde iki gruba ayrılır. Tek zincir kırılmalarında DNA molekülünün çift zincirlerinden bir tanesinde kopma meydana gelmesiyle oluşur. Çift zincir kırılmaları ise, ya tek bir enerji transferi olayı ile ya da iki tek zincir kırılmasının birbirine yakın ve karşılıklı bölgelerde oluşması sonucu ortaya çıkar.

Çok yüksek radyasyon dozlarında, DNA moleküllerinde bahsedilen kırılmaların dışında ağır nükleer parçalanmaların meydana gelebileceği bilinmektedir. Bu şekilde çok küçük moleküller ortaya çıkar ve bunların birleşmesi sonucunda küçük DNA parçasından oluşan kümeler meydana gelebilmektedir (14,20,21).

DNA molekülünde radyasyon etkisi ile ortaya çıkabilecek diğer bir yapısal değişiklik baz hasarları ve kayıplarıdır. Bu hasarlar açısından pirimidinler, purinlere oranla yaklaşık 2 kat daha duyarlıdırlar. Timin ise en duyarlı baz olup çapraz bağlanmalar da önemli bir yapısal hasar grubunu oluşturur. Bu tip bağlanmalar DNA molekülü içinde aynı zincirde ya da zincirler arası oluşabileceği gibi DNA-protein çapraz bağlanmaları şeklinde olabilirler (14,20,21).

Radyasyona karşı duyarlılığı en hassastan en dirençliye doğru sıralayacak olursak; hızlı bölünen, farklılaşmamış en duyarlı hücreler eritroblastlar, bağırsak kript hücreleri, sperm ve oosit ana hücreleri ve epidermis bazal hücreleridir. Hücreler farklılaştıkça hızlı bölünme devam etmesine karşın, duyarlılıkları da azalmaktadır. Radyasyona karşı duyarlılık yasasına göre karaciğer, kas, beyin, kemik, kırık ve bağ dokuları dirençli doku ve organları oluşturmaktadırlar. Kemik iliği, ovaryum ve testislerin bölünen hücreleri, mide-bağırsak ve epitel hücreleri ise radyasyona karşı en duyarlı hücre gruplarını oluştururlar (20).

2.4. Biyolojik Doz Birim

Radyasyon enerjisinin emilimi ve canlı sistemdeki dağılımı ile başlayan olaylar sonuçta biyolojik etkilerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Aynı tip iyonlaştırıcı radyasyonların farklı dozları ya da farklı tip iyonlaştırıcı

radasyonların aynı dozlarının oluşturdıkları biyolojik etkenlerin benzer olmadıklarını söylemek mümkündür. Uygulanan radyasyon ve uygulama şekli ile ilgili bazı özellikler, enerji emilimi ve dağılımı süreçlerinde büyük ölçüde belirleyici olurlar (14).

Doz, herhangi bir maddenin belli bir zaman içerisinde kullanılan veya tüketilen miktarı demektir. Radyasyon dozu ise hedef kütle tarafından belli bir sürede soğurulan veya alınan radyasyon miktarıdır (14,19).

Biyolojik doz radyasyonun canlı dokularda soğurulan miktarını ifade etmek için kullanılmaktadır. Ancak soğurulan dozun biyolojik etkinliği hakkında fikir vermez. Dolayısıyla radyasyonun canlı doku üzerindeki etkilerini belirlemede kullanılacak doz biriminin tüm faktörleri içermesi gerekir. Bu faktörler kalite faktörü adı altında toplanmıştır. Biyolojik dozun geleneksel birimi Rem'dir. Rem, Rad ile kalite faktörünün çarpımından oluşmaktadır. Rem'in SI sistemindeki yeni birimi Sievert (Sv) olup Gray (Gy)'ın kalite faktörü ile çarpımından elde edilmektedir. X ışını kalite faktörü 1 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle pratik olarak $1 \text{ Rad} = 1 \text{ Rem}$ olarak bilinir. $1 \text{ Sv'de } 1 \text{ Gy'e eşit olur}$. Birbirine dönüştürmeden $1 \text{ Sv} = 100 \text{ Rem}$ veya $10 \text{ mikrosievert} = 1 \text{ milirem}$ şeklindedir (14,19).

2.5. Radyasyonun Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Yapılan deneysel çalışmalar gösteriyor ki radyoterapi tedavileri hem hayvan hem de insan üreme hücrelerinde mutajeniteye ve insan ovaryum işlevsizliğine neden olabilmektedir. Elde edilen verilere göre oosit radyosensitivitesi geniş ölçüde türlere ve folliküler fazlara göre çeşitlenmektedir (22).

Gonadlar radyasyona ileri derecede duyarlıdır. Radyasyon gerek ovumda, gerekse spermde mutasyon ve aberasyonlara yol açabilir. Kalıcı veya geçici infertiliteye sebep olabilir. İnfertilite yapıcı etki, erkeklerde kadınlardan daha belirgindir. Kadında ovum ve primordiyal folliküler hücreler, erkekte ise spermatogonyumlar en duyarlı hücrelerdir (23).

İyonize radyasyonun, ovaryum ağırlığında azalışa ve ovaryum folliküler atrezisinde artışa neden olduğu deneylerle ortaya konmuştur (24).

Jarrell ve ark. (24) göre, radyasyona maruz kalan ovaryumların yapısında önemli değişiklikler meydana gelmiştir. Son çalışmalar gösteriyor ki radyasyon, ovaryum işlevlerini bozmanın yanı sıra, oositlerin kromozomal hasarına ve

follikülerde hücre apoptosiz'ine sebep olmaktadır. Atretik folliküllerde granüloza hücre ölümü, apoptosize yol açmaktadır. Radyasyona maruz kalan fare ovaryumunda, folliküller, granüloza hücrelerinin apoptozisi ile dejenere olmuşlardır.

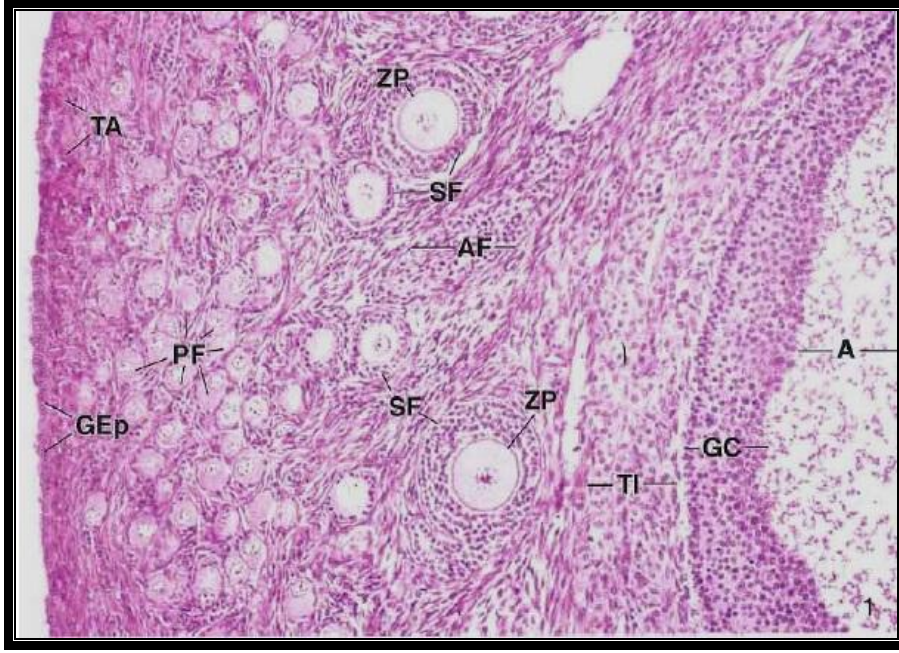
Atretojenik uyarılardan birisi folliküler atreziyi hızlandırabilecek olan γ radyasyonudur. Hem normal hem de tümürlü dokuların her ikisinde de apoptozis yalnızca kendiliğinden oluşmaktadır, ilave olarak iyonize radyasyon da apoptozise neden olmuş olabilir. Rat ve farelerde primordiyal folliküllerdeki oositler radyasyona, gelişen folliküllerdeki oositlerden daha fazla hassastır (25).

Ovaryum folliküllerinde, γ radyasyonu tarafından hızlandırılan folliküler dejenerasyon, kontrollerle karşılaştırıldığında, radyasyona maruz kalan fare ovaryumlarında apoptotik granüloza hücre sayısı artmıştır. Ayrıca, γ radyasyonuna maruz kalan fare ovaryumlarında, dejenere folliküllerde apoptotik gövdeler ve hücrel rezidüel artmış ve sıklıkla fagositoz gözlemlenmiştir. Hasarı tam anlamıyla belirlemek zor olmasına rağmen, radyoterapinin oosit havuzunun zayıflamasına neden olduğu iyi bilinmektedir (25).

2.6. Ovaryum Histolojisi

Ovaryum en dıştan tek sıralı yassı epitelden kübiğe (epithelium superficiale-germinativum) değişen bir epitel ile sarılmıştır. Ovaryum yüzeyindeki bu epitel tabakası, embriyoda birkaç kez çoğalarak primer ve sekonder cinsiyet kordonlarını yapan peritonal mezotelyumdan geliştiği için 'germinal epitel' (epitelyum germinale) olarak adlandırılır (Şekil 2). Epitelin periton'a bakan yüzünde mikrovillus'lar ve az sayıda kinosilya'lar bulunur. Hücre sitoplazması mitokondri ve pinositoz veziküllerinden zengindir. Germinal epitelin altında damardan fakir, sıkı kollajenöz bağ dokusundan yapılmış tunika albuginea bulunur. Bu katmandaki kollajen lifler ovaryum yüzeyine koştur yerleşmişlerdir. Kesitlerde her bir ovaryum'un içte medulla dışta korteks olarak iki bölümü ayırt edilir. Bu katmanlar arasında kesin bir sınır yoktur (26-30).

Medulla, kollajen demetlerden ve elastik lif ağlarından yapılmış bir bağ dokusu içinde, kan ve lenf damarları, kalın sinir demetleri ve hilus yakınında birkaç düz kas hücresi içerir.



Şekil 2. Ovaryum dokusunun hematoksilin-eozin ile boyanmış kesiti. A: Antrum, GEp: Germinal epitel, TA: Tunika albuginea, ZP: Zona pellusida, PF: Primordiyal folliküller, SF: Sekonder folliküller (30).

2.6.1. Ovaryum Korteksi

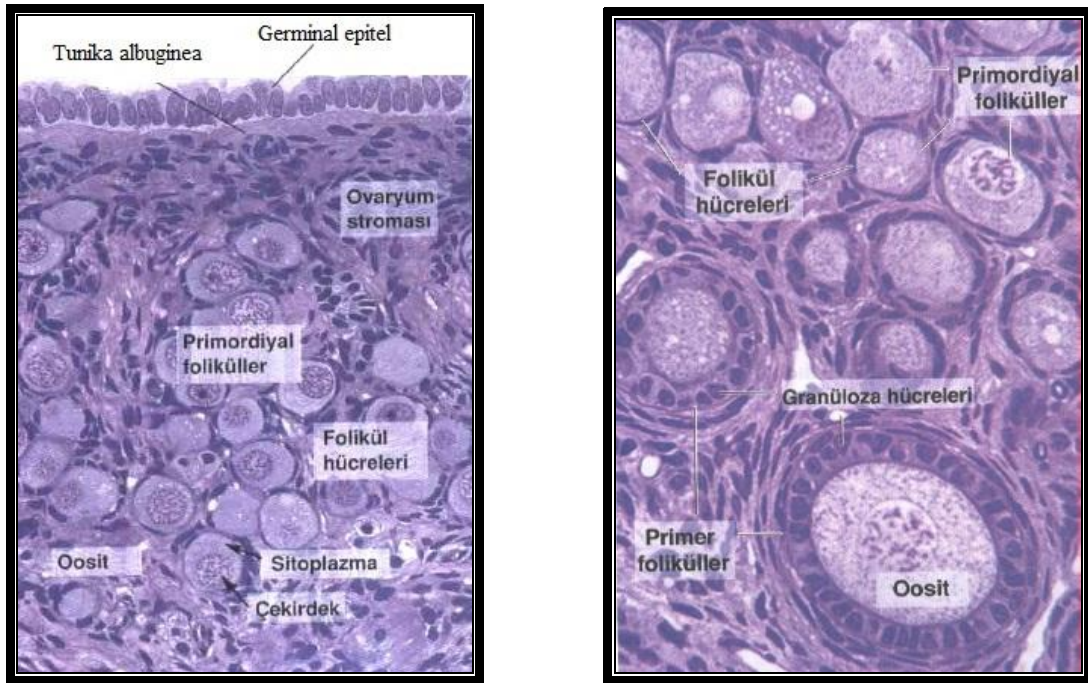
Korteks, stroma ve çeşitli gelişim evrelerindeki ovaryum folliküllerinden oluşur. Stroma, kollajen ve elastik lifler, retiküler lif ağları ve iğ biçimli bağ dokusu hücrelerinden (fibroblastlar) yapılmıştır. Bu fibroblastlar, hormonal uyarılara diğer organların fibroblastlarından farklı yanıt verir. Korteksin bu interstisyel bağ dokusu germinal epitel altında sıkılaşıarak tunika albuginea'yı oluşturur. Kortekste stroma içinde çeşitli gelişim evrelerinde folliküller yerleşmiştir (26, 27, 29, 30).

2.6.2. Ovaryum Folliküllerinin Gelişimi (Follikülogenezis)

Bir ovaryum follikülü, bir ya da daha fazla follikül ya da granuloza hücre tabakasıyla çevrili bir oosit içerir. Folliküler hücreler mezotelyal epitelden gelişen germinal epitele benzerler. Menapoz'dan sonra folliküllerin az bir kısmı kalır. Her 28 günde bir ovaryum'lardan bir oosit atılır. Bir kadının üreme süreci 30-40 yıla değin sürer. Bu süre içerisinde yaklaşık 450 oosit atılır. Folliküler gelişimde 4 evre ayırt edilir (26-30).

2.6.2.1. Primordiyal Follikül

Primordiyal folliküller, fetal yaşam sırasında oluşan tek sıralı yassı follikül hücreleriyle çevrili primer oosit'leri içerir. Primer oosit'ler 25 (mikrometre) μm çapında yuvarlak şekilli hücrelerdir. Geniş ve periferik yerleşimli çekirdekleri tek çekirdekçik kapsar (Şekil 3). Primer oosit'ler organellerden zengindirler. Çok sayıda mitokondri, gelişkin golgi kompleksi, granüllü endoplazmik retikulum tubulusları ve birkaç ribozom içerirler. Bu folliküller, korteksin en üst katmanında yer alırlar ve sayıları artmaz. Ancak cinsel yaşam süresince büyüyüp gelişirler ve çoğu dejenere olur (26,27).



Şekil 3. Primordiyal ve primer folliküller (29).

2.6.2.2. Primer Follikül

Pubertenin başlamasıyla birlikte, her menstrüel döngüde 5-15 arası primordiyal follikül olgunlaşmaya başlar. I. mayoz bölünmenin diploten evresinde olan oosit I büyür, oosit'i çevreleyen follikül hücreleri önce kübikleşir ve sonra çoğalarak çok sıralı bir epitel tabaka oluştururlar. Bu hale gelen folliküle, primer follikül denir (Şekil 3). Primer oosit'in çapı yaklaşık 100-150 μm 'dur ve genişlemiş bir çekirdek, çok sayıda Golgi kompleksi ve mitokondri, gelişkin granüllü endoplazmik retikulum tubulusları ve serbest ribozomlar içerir.

Oosit'in çevresindeki follikül hücreleri zamanla kübikleşir ve bu folliküle 'tek tabakalı (büyüyen, unilaminar) primer follikül' denir. Follikül hücreleri çevrelerindeki stromal hücrelerden bir bazal membranla ayrılmışlardır. Folliküler hücreler çoğalmaya başladıklarında çok tabakalı hale gelirler ve granüloza hücreleri olarak adlandırılırlar. Follikülün bu haline 'çok tabakalı (preantral, multilaminar) primer follikül' denir. Granüloza hücrelerinin çoğalma yetisi primer oositçe üretilen aktivin ile gerçekleştirilir. Bu evre süresince granüloza hücreleri ve oosit glikoprotein yapısında bir madde salgırlar. Bu madde oosit'in çevresinde zona pellusida olarak adlandırılan bir tabaka oluşturur. Zona pellusida ZP1, ZP2 ve ZP3 denilen 3 farklı glikoproteinden oluşur. Ayrıca follikül hücre zarı eldiven parmağı biçiminde küçük sitoplazmik uzantılar içerir. Bunlar zona pellusida'yı geçerek, oosit yüzeyindeki mikrovilluslarla sıkı bağlantı birimleri (gap junction) aracılığıyla bağlanırlar. Bu sitoplazmik uzantılar folliküler gelişim süresince iletişim kurarak besin maddelerinin follikül hücrelerinden geçişini kolaylaştırırlar.

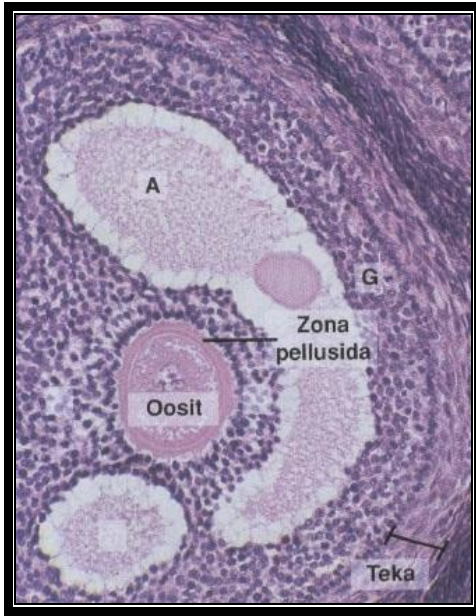
Follikülün dışındaki stromal hücrelerin oluşturduğu teka follikülü de iki tabakaya ayrılır. İçte salgı yapan hücrelerden oluşan, kan damarlarından zengin teka interna, dışta fibroblast benzeri hücreler içeren bağ dokusundan yapıli teka eksternadan oluşur. Teka internayı oluşturan hücreler hücre zarlarında Luteinleştirici Hormon (LH) reseptörleri içerirler. Ayrıca sitoplâzmalarında çok sayıda yağ damlaları, granülsüz endoplazmik retikulum tubulusları ve tubuler kristali mitokondriler kapsarlar. Teka interna hücreleri androstenedion üretirler ve bu hormon granüloza hücrelerine girerek aromataz enzimiyle östradiol'e dönüşür. Granüloza hücreleri ile teka interna hücreleri arasında kalın bir bazal lamina vardır (26,27).

2.6.2.3. Sekonder Follikül

Gelişme ilerledikçe çok tabakalı primer follikül 200 µm çapa ulaşır ve granüloza hücrelerinin arasında içi sıvı dolu boşluklar belirir. Kısa sürede boşluklar birbirleriyle birleşerek yarım ay şeklinde follikül antrum'unu oluşturur. Bu hale gelen folliküle 'sekonder follikül' denir (Şekil 4). Sekonder follikül'ün granüloza hücrelerinin çoğalması hipofiz ön lobundaki bazofil hücrelerinden salınan Follikül Uyarıcı Hormon (FSH)'a bağlıdır. FSH'in etkisi altında granüloza hücrelerinin sayısı artar ve hücrelerarası boşluğa follikül sıvısı birikir. Bu sıvı

glikozaminoglikan, proteoglikan ve hormon bağlayıcı proteinleri içeren kan plazması benzeridir. Ayrıca follikül sıvısı hormonlardan progesteron, östradiol, inhibin, follistatin ve FSH ile LH'nin salınımını düzenleyen aktivin içerir. Zamanla granüloza hücreleri yeniden düzenlenmeye başlar ve primer oosit bir miktar granüloza hücresiyle birlikte antrum boşluğu içinde bir kenara toplanır. Bu yapıya 'kumulus ooforus' denir. ZP çevresinde gevşek yerleşmiş kübik ya da alçak boyulu prizmatik granüloza hücreleri sitoplazmik uzantılarıyla oosit ile bağlantılarını sürdürmektedirler. Primer oosit'i çevreleyen bu tek sıralı granüloza hücre tabakasına 'korona radiata' denir. Diğer granüloza hücreleri poligonal şekillidirler. Oosit sitoplâzmasında mitokondriler çekirdek yakınında toplanırlar. Sitoplâzma protein-lipit yapısında vitellus oluşmaya başlar.

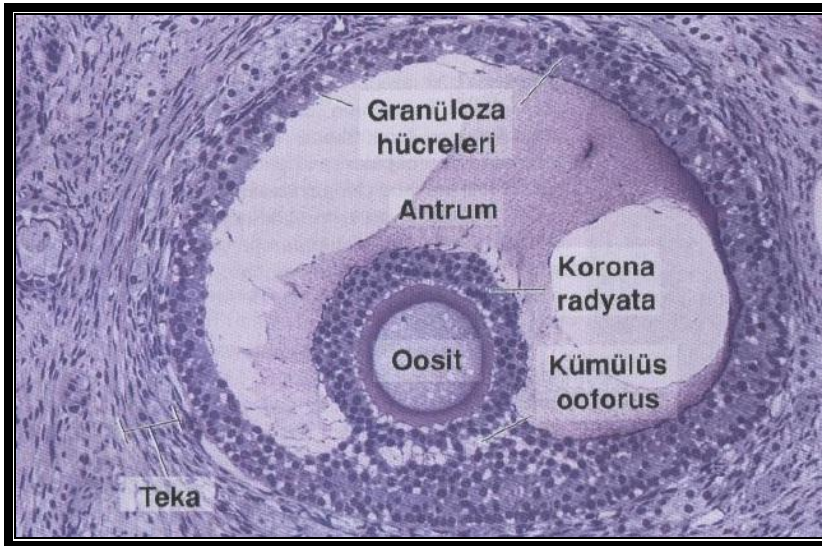
Bu evrenin sonuna doğru stromal hücreler genişlemeye başlar ve teka interna yaygın ağ oluşturmuş kapillerle beslenir. Sekonder follikül aşamasına gelmiş çoğu follikül, atreziye uğrar. Ancak atretik folliküllerin bazı granüloza hücreleri dejenere olmaz ve menapoz'a değin düşük düzeylerde androjen salgılayan interstisyel bezlere dönüşür (26,27).



Şekil 4. Sekonder (antral) bir follikülde oosit, ZP ve granüloza hücreleri. Henüz tam birleşmemiş antrum boşlukları (A), granüloza hücrelerinin (G) arasında görülüyor (29).

2.6.2.4. Preovulatar Folliküller (Graaf Follikülleri)

Birkaç sekonder follikül, olgun follikül oluşturmak üzere gelişmeyi sürdürür ve 'Graaf (tersiyer, preovulatar) follikül'ü' oluşturur. Graaf follikülünde granüloza hücreleri çoğalır, antrum genişler ve follikül sıvısı ile dolar. Ovulasyondan hemen önce follikülün çapı 2,5 cm'ye ulaşır. Follikül duvarındaki folliküler hücreler membrana granüloza'yı oluştururlar (Şekil 5). Graaf follikülünde primer oosit'in çevresindeki korona radiata ve kumulus ooforus oluşumunu sürdürür ve zamanla tutunduğu yerden ayrılır ve follikül sıvısının içinde serbest kalır. Graaf follikül'ü en dıştan saran bazal membran kalın, homojen ve saydamdır. Buna camsı zar denir. Graaf folliküllü döngünün başlangıcından başlayarak 10-12 günde oluşur (26,27).



Şekil 5. Olgun bir follikül (Graaf follikülü). Oosit kenara itilmiş durumda. Oositin hemen dışında ZP oldukça belirgin. Granüloza hücrelerinin etrafında teka tabakasında gözlenmekte (29).

2.6.2.5. Atretik Follikül

Atretik folliküller doğum öncesinden başlayarak menapoz sonrasındaki birkaç yılda da ovaryumda gözlenirler. Genelde menstrual döngü süresince her ovulasyonda bir oosit atılır. Dişilerin tüm yaşamı boyunca, ovaryum'da yerleşik çok sayıda çeşitli evredeki folliküllerden yalnızca % 0,1'i olgunlaşıp ovulasyona uğrar. Bu nedenle ovaryum folliküllerinin büyük bölümü, follikül hücreleri ve oosit'in ölümüyle geriler ve fagositoz yapan hücrelerce ortadan kaldırılırlar. Bu işlev

sırasında granüloza hücrelerinde mitoz durur, granüloza hücreleri bazal membran'dan ayrılır ve dejenere olurlar (26-30).

2.7. Ovulasyon

Menstrüal döngünün 14. gününde gelişmekte olan Graaf follikülü'nün granüloza ve teka hücrelerinden salgıyan östrojen nedeniyle kandaki östrojen düzeyi artar. Bu da uterus endometriyumunun folliküler ya da proliferatif evreye girmesi, servikal mukus'un spermatozoonların içeri girmesine izin verecek kadar incilmesi ve hipofizi LH salgılaması için uyarır. LH'in döngünün tam ortasında aniden yükselmesiyle olgunlaşmayı destekleyen etkenlerin yoğunluğu artar ve o zamana değin diploten evresinde kalmış olan primer oosit'in I. Mayoz bölünmesini tamamlamasını ve follikülün tersiyer evreye girmesini sağlar. Aynı zamanda II. Mayoz bölünme başlar ancak oosit, ovulasyondan yaklaşık 3 saat öncesine kadar metafaz evresinde duraklar. Bu sırada ovaryum'un yüzeyinde bir kabarıklık oluşur ve bu kabarıklığın tam tepesinde 'stigma' olarak adlandırılan damarsız bir nokta belirir. Yüksek LH düzeyi kollajenaz yetisini artırır ve follikülün çevresindeki kollajen lifler sindirilir. LH düzeyindeki ani artışın diğer etkisi prostaglandin miktarını arttırmasıdır. Prostaglandin, ovaryum duvarında yerel kas kasılmalarına neden olur. Oosit, bu kasılmalarla çevresindeki granüloza hücreleriyle birlikte, kumulus ooforus bölgesinden dışarı atılır ve ovaryum'un dışında gezinir. Fimbria ovarika'ların hareketi ile oosit tuba uterina'nın içine alınır (26-30).

Ovulasyon puberteden menapozda değin 28 günde bir olaylanır. Ovulasyon iki kanama arasındaki döngünün ortasına rastlar. Ovulasyon, döngünün 14. gününde gerçekleşir. Ovulasyonda genelde bir oosit atılır. Bazen aynı anda birkaç oosit atılabilir.

Graaf follikül'ünde ovulasyon sonrasında bir iç basınç düşmesi gerçekleşir. Teka tabakalarından kan sızması ile kısa bir süre için follikül içine kan toplanır. Bu yapıya korpus rubrum (kırmızı cisim) denir (28-30).

2.8. Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra yırtılan tersiyer follikülünün duvarında kalan granüloza ve teka interna hücreleri yaşamlarını çevrelerindeki damarlar yoluyla sürdürürler. LH'in etkisiyle bu hücrelerin sitoplâzmalarında sarımsı bir pigment

birikmeye başlar ve büyüyerek granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücrelerine dönüşürler. Bu hücrelerin oluşturduğu geçici endokrin bez yapısına korpus luteum (sarı cisim) denir. Korpus luteum; progesteron ve östrojen hormonlarını salgılar. Progesteron, östrojenik hormonların da katkısıyla, uterus mukozasının embriyonun implante olabilmesine uygun duruma geldiği sekretuar ya da progestasyonel vereye girmesini sağlar (26-30).

Döllenme olmadığında, ovulasyonu izleyen 9. günde korpus luteum erişebileceği üst boyuta ulaşır ve ovaryumun yüzeyinde sarımsak bir çıkıntı şeklinde izlenebilir. Bu yapı daha sonra progesteron üretimi azaldığı için dejenere olur ve menstrual kanama başlar. Buna 'menstruasyon korpus luteumu' denir (28, 29, 30).

Oosit'in döllenmesi durumunda, gelişmekte olan embriyonun sinsityotrofoblastlarca salgılanan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu ile korpus luteum'un dejenere olması engellenir. Böylece, korpus luteum büyümesini sürdürür ve gebelik korpus luteumuna (korpus luteum graviditatis) dönüşür. Bu yapı gebeliğin 3. ayının sonunda ovaryum'un 1/3 ile 1/2'si büyüklüğüne ulaşır. Sarımsak renkteki luteal hücreler dördüncü ayın sonuna değin progesteron salgılamayı sürdürürler. Bu süreçten sonra plasenta'nın trofoblastik bileşenince salgılanan progesteron'un miktarı gebeliğin sürdürebilmesine yetecek düzeye geldiği için, luteal hücreler yavaş yavaş dejenere olurlar. 4. aydan önce gebelik korpus luteum'unun ortadan kaldırılması genelde düşükle sonuçlanır (26,27).

Menstruasyon ve gebelik korpus luteum'ları işlevleri sonlanınca dejenerasyona uğrarlar. Yerlerini kollajen liflerden zengin bağ dokusundan yapılı, beyaz renkli bir yapı olan korpus albikansa (beyaz cisim) bırakırlar. Bu yapı ovaryum içerisinde zamanla absorbe edilerek ortadan kalkar (28-30).

2.9. Ovaryum Medullası

Ovaryum'un merkezi olan medulla gevşekçe örgü oluşturan kollajen ve elastik lifler ile fibroblastlar içeren bağ dokusundan oluşur. Medulla ayrıca büyük kan, lenf damarları ve sinir lifleri içerir. Folliküler atrezi sırasında granüloza hücreleri ile oosit'ler dejenerasyona uğrarken, teka interna hücreleri etkin steroid salgı yapmayı sürdürürler. Medullada yerleşik bu epitelooid hücrelere 'interstisyel hücreler' denir. Bu hücreler, kümeler oluşturmak üzere biraraya gelirler ve

'interstisyel bezleri' oluştururlar. İşlevlerini puberteden başlayıp menapoz'a değin sürdürürler ve östrojen salgırlarlar.

Hilus hücreleri, ovaryum medullasındaki diğler epiteloid tip hücrelerdir. Bu hücreler testislerdeki Leydig hücreleriyle eşdeğ organel içeriğı ve sitoplazmik özelliğ sahiptirler. Ayrıca androjenleri salgırlarlar (26,27).

2.10. Oositin Gelişimi (Oogenezis)

Yumurta ana hücreleri oogonyum'lar, vitellüs kesesi endoderminden kökenlenen hücrelerdir ve embriyonik ovaryumda ard arda bölünerek sayılarını artırırllar. Bu evrede primordiyal folliküller, birinci mayoz bölünmeye giden primer oositleri içerirler. Ancak, bu primer oositler birinci mayoz bölünmelerini tamamlamadan, birinci mayozun, profazının diploten evresinde uzun bir bekleme dönemine girerler. Bireyin cinsel olgunluğ erişmesini takiben, her ovaryum siklusunun başında gelişmeye giden 20 kadar primordiyal follikül, aldıkları uyarı ile mayoz bölünmelerine durakladıkları yerden devam ederler. Graaf follikül'ünde, ovulasyondan önce birinci mayoz bölünme tamamlanmış ve iki yavru hücre oluşmuştur. Bunlardan büyüğü sekonder oosit, küçüğü birinci kutup hücresidir. Sekonder oosit, ikinci mayoz bölünmesinde başlar, ancak bu bölünme de ovulasyona kadar tamamlanamaz. İkinci mayoz bölünmenin metafazındaki sekonder oosit, ikinci bir bekleme evresine girer. Ovulasyonda, ovaryumdan atılan sekonder oosit, ikinci mayoz bölünmenin metafaz evresindedir. Bu evredeki sekonder oosit, ovidukt'ta aldığı uyarı ile ikinci mayoz bölünmesini tamamlar ve ikinci kutup hücresi ile n kromozom taşıyan 'yumurta' (ovum) meydana gelir (31).

2.11. Curcumin

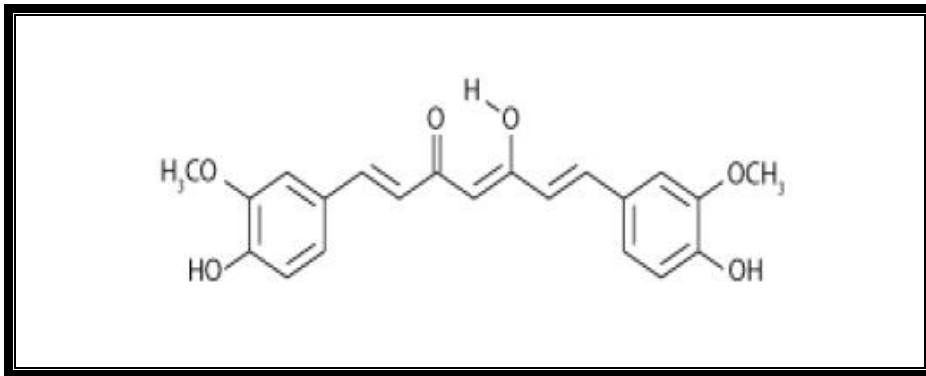
Zerdeçal (Curcuma longa, Turmerik, Hint safranı), Çin ve Hindistan'da yaygın olarak yetiştirilen zencefil ailesine ait sarıçiçekli, büyük yapraklı ve yumrulu, çok yıllık otsu bir bitkidir. Zerdeçal kullanımı; çeşitli hastalıklar için tedavi edici bir ajan olarak etkili olduğ bulunduğundan bu yana, daha popüler bir hale gelmiştir. Zerdeçal, Hint tıbbında bir tonik ve kan temizleyicisi olarak kullanıma girmiş olup, çeşitli hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Zerdeçal içinde doğall sarı bir pigment olan curcumin, bitkinin yumrularından elde edilir. Zerdeçal baharatının en aktif bileşeni, %2-5'ini oluşturan curcumindir (32,34).

İn vitro ve deneysel hayvanlarla yapılan araştırmalarda, curcumin'in; antitümör, antioksidan, antiartritik, antiamiloid, antiiskemik ve antiinflamatuvar ve antimikrobiyal ajan olarak kullanımı deneysel olarak ispatlanmıştır (32,33,36).

Curcuminin bazı tip kanser hücrelerinin ölüm hızını artırdığı ve tümör hücrelerinin bölünmesini durdurduğu bilinmektedir. Ayrıca curcuminin radyoterapinin etkisini artırmak sureti ile tedaviden daha hızlı sonuç alınmasını sağladığı gösterilmiştir. Bu etkilerine ilave olarak antioksidan özellik göstermesiyle alkolün, ilaçların, radyasyonun, ağır metallerin; normal organlar üzerinde oluşturduğu hasarları önleme etkisine sahip olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda curcuminin, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan radyasyon veya kemoterapötik ajanların etkinliğini artırmada ve tedaviden kaynaklanan normal doku hasarını önlemede etkili olduğunu gösteren pek çok çalışma yayınlanmıştır (34).

2.11.1. Curcumin Kimyası

Curcuminin kimyasal yapısı, 1910 yılında elde edilmiştir ve moleküler formülü $C_{21}H_{20}O_6$ 'dır (Şekil 6). Bu maddenin antioksidan mekanizması son zamanlarda, kimyagerlerin ve biyologların ilgisini çekmiştir. Antioksidanların pek çoğu hem fenolik fonksiyonel bir grup hemde bir β -diketon grup taşır. Curcumin, metoksi ve hidroksil'lerin çeşitli miktarlarını içeren fenil halkaları, β -diketon grup ve karbon-karbon çift bağ içeren fonksiyonel gruplarının bir çeşitliliğine sahip olan eşsiz bir antioksidandır (35,32).



Şekil 6. Curcuminin molekül yapısı (35).

2.11.2. Curcumin Biyosentezi

Curcuminin biyosentetik yolunu ortaya çıkarmak araştırmacılar için çok zor olmuştur. Roughly ve Whiting (36), curcuminin biyosentezi için farklı mekanizmalar önermişlerdir.

Mekanizmalar arasında en kabul göreni; iki sinamer biriminin, Malonil-CoA ile birleşmesiyle ortaya çıkan mekanizmadır. Mekanizmanın başlangıç noktası olarak, fenilalanin'den oluşan sinamik asit kabul edilmektedir. Fonksiyonel gruplardaki sıralanma, alkol ve metoksinin curcuminoid'e ilave edilmesi, önerilen bu mekanizmayı daha güçlü bir şekilde desteklemektedir.

2.11.3. Curcuminin Antioksidan Özellikleri

Bir antioksidan molekülü diğer molekülün oksidasyonunu engelleyebilir. Oksidasyon, oksitleyici bir ajanın bir molekülden bir elektrona transferini sağlayan kimyasal bir reaksiyondur. Oksidasyon reaksiyonu, hücrenel hasara neden olan serbest radikalleri oluşturur. Antioksidanlar, serbest radikal türlerinin yok edilmesi ve diğer oksidasyon reaksiyonlarının oksitlenmesini engeller ve bu reaksiyonla sonlanır.

Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere hücrenel hasara ve reaktif oksijen türler'ine (ROT) karşı vücudumuzu koruyan iki ana antioksidan savunma sistemi mevcuttur. Enzimatik olmayan sistem glutasyon, ürik asit, C vitamini ve E vitaminini gibi önemli antioksidanları kapsamaktadır. Antioksidan enzimler ayrıca vücudumuz tarafından üretilen katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz'ı (GSHpx) içermektedir. Antioksidan sistemin bu iki tipi, hücredeki oksidanın herhangi zararlı etkilerini iyileştirmek için beraber çalışırlar. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların her ikisi de hücre dışı ve hücre içindeki serbest radikal türlerini temizlerler. Bu süpürücü ajanlar hücrelerde stratejik olarak yerleşmişlerdir ve maksimum hücre içi koruma sağlarlar.

Son zamanlarda, curcuminle ilgili sağlık üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Zencefilin, su ve yağ ile çözülebilir ekstratlarının ve curcuminin bileşikleri vitamin E ve C ile karşılaştırıldığında güçlü antioksidan aktiviteleri gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada curcuminin, lipid peroksidasyonu engellemede E vitaminine göre sekiz kat daha kuvvetli olduğu kanıtlanmıştır (35).

2.11.4. Curcuminin Radyoprotektif Etkileri

Radyasyonun zararlı etkilerine karşı korunmada, kimyasalların kullanımına II. Dünya Savaşından sonra başlanmıştır. Radyoterapi esnasında normal doku korunmasının kanser hücrelerinin tahribatı kadar önemli olduğunun gösterilmesiyle, korunma araştırmaları üzerine odaklanmış çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla, çok sayıda kimyasal bileşikler ve analogları radyoprotektif etkileri açısından araştırılmıştır.

Ancak hastaların diğer ilaçlardan daha iyi bir şekilde doğal besinsel ajanları tölere edebilmelerine rağmen, bugüne kadar insanlar tarafından kullanılan besinsel ajanlar, potansiyel radyoprotektör etkileri için hak ettikleri önemi görememişlerdir (34).

Curcuminin radyoprotektif etkisinden birden fazla mekanizma sorumludur. Radyasyon aracılı serbest radikalleri süpürme ve ışınlanmış sistemlerde curcumin ile hücre sel antioksidanların yükseltilmesi bu aktiviteden sorumlu temel mekanizmalar olarak düşünölmektedir. Katalaz, glutatyon transferaz (GST), GSHpx, SOD ve onların mRNA'larının upregölasyonu curcumin aracılı radyasyondan korunmada bir diğer mekanizma olabilir. Curcuminin, GST, GSHpx, SOD ve sülfidril gruplarını yükselttiği, lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, antioksidan durumunu artırdığı, serbest radikalleri süpürdüğü çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (34).

Curcumin aktivitesinin ilginç bir yönü, hem normal hücreler üzerine hemde kanserli hücreler üzerine radyoprotektif etkisini göstermesidir. Bu, Curcumin aktivitesinin oksidatif stresi azalttığını ve oksidatif stresle ilgili genlerin transkripsiyonunu engellediğini ve radyasyonun zararlı etkilerine karşı inflamatuvar yanıtlarda koruma sağlayabileceğini desteklemektedir (25,34).

Normal olarak ovaryum siklusunda, oksidatif stresin çeşitli işaretliyecilerinin varlığı gösterilmiştir. Folliküler sıvıdaki mikroçevrede: lökositler, makrofajlar, sitokinler, bilinen ROT kaynaklarının tümü bulunur. Folliküler sıvıdaki ROT; lüteoliziz, ovaryum sterodiyogenesisiz, follikölogenesisiz ve oosit maturasyonunda önemli bir rol oynar. Folliküler gelişim, preovulator follikülleride küçük primordiyal folliküllerin gelişmesinide kapsar. alışmalar gösteriyor ki, follikölogenesis süresince, programlı folliküler hücre ölümü ve folliküler gelişiminde NO radikalleri oluşur. Oksidatif stres kontrolü ovulasyon

için gereklidir. Oosit maturasyonunun son aşaması, follikül yırtılmasını kolaylaştırıcı ve ovaryum kan akışını etkileyen, ROT'un seviyesindeki artış, steroidler, NO, proteolitik enzimler, prostaglandinler ve sitokinlerdeki dalgalanmalarla ilgilidir. Oksidatif enzim aktivitesinin bir derecesi, ovaryum sterodiyogenesisinde oksidatif stresin rolü, teka hücreleri, granüloza lütein hücreleri ve hilus hücreleri tarafından gösterilmiştir (37).

2.12. PARP

2.12.1. Poli (ADP-riboz)

ADP-ribozun proteinlere aktarımı ilk olarak *Corynebacterium diphtheria*'dan elde edilen bakteriyal bir toksinde bulunmuştur. ADP-ribozun negatif yüklü polimerlerinin proteinlere eklenmesi, Nikotinamid Adenin Dinükleotit (NAD⁺)'den Poli ADP-riboz polimerazların (PARPs) sentezlemesi aracılığıyla gerçekleşir ve tek taraflı bir translasyon sonrası düzenlenimidir. PARP, sadece hücrenin yaşamsal faaliyetleri ve programlı hücre ölümü ile ilgili değil aynı zamanda PARP ailesinin yeni üyelerinin sahip olduğu ilişkileri ile diğer biyolojik işlevleri de düzenler. Bu işlevler arasında, transkripsiyonun düzenlenmesi, telomer kohezyonu, hücre bölünmesi esnasında mitotik içcik şekillenmesi, hücre içi beslenme ve enerji metabolizması sayılabilir (38).

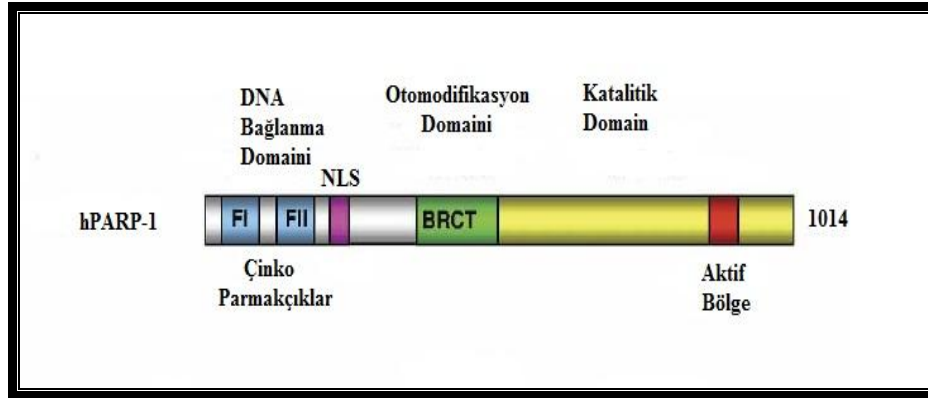
2.12.2. PARP-1 Proteininin Yapısı ve Fonksiyonu

PARP ailesinin prototipik enzimi PARP-1'dir. Yaklaşık kırk yıl önce, Chambon, Weill ve Mandel tarafından keşfedilmiştir ve biyokimyagerler tarafından ilgi çekmiş ve temel uğraş alanı olmuştur fakat daha sonra radyobiyologlar, toksikologlar, genetikçiler, moleküler biyologlar, farmakologlar, hücre biyologları ve diğer biyolojik disiplinlerden uzmanların da ilgisini çekmeyi başarmıştır (39).

PARP süper ailesinin üzerinde en çok çalışılan üyesi PARP-1'dir (Şekil 7). DNA hasarına bağlı olarak NAD⁺'ı kullanarak daima kromatin ile ilişkili çekirdekteki kabul edici (akseptör) proteinlere çok dallı veya düz olacak şekilde ADP-riboz polimerlerini sentezler (40). PARP-1, 1q41-q42 kromozom bölgesinde bulunan ADPRT geninin 113 kDa ağırlığındaki transkripsiyon ürünüdür (41,42).

PARP-1'in yapı-işlev ilişkisi oldukça iyi anlaşılmıştır. Altı domainden dördünün özel fonksiyonları gösterilmiştir;

- Domain A, DNA bağlayıcı domain olarak bilinir ve DNA kırıkları ile PARP-1 arasındaki ilişkiden sorumlu olup 2 adet çinko parmak modeli içermektedir.
- Domain B, NLS için çift taraflı bir PARP-1 ve Kaspaz-3 yarıklanma bölgesinin bulunduğu domain.
- Domain D, otomodifikasyon bölgesidir.
- Domain F, PARP-1'in katalitik bölgesidir (40).



Şekil 7. PARP-1 proteininin yapısı (42).

Çinko parmak modelleri PARP-1'in hasarlı DNA üzerindeki bölgesini tanıması için gereklidir (41,42). İlk çinko parmak hem tek hemde çift zincirdeki kırığa bağlanırken ikinci çinko parmak yalnızca tek zincir kırıklarını tanımaktadır (42). Merkezi otomodifikasyon domaini poli(ADP-riboz)ilasyon (PARilasyon) bölgesini içermektedir ve PARP-1'in DNA ile bağlantısını düzenlemekle görevlidir. C-terminal bölgesi ise, NAD'ın bağlandığı bölgedir (41).

PARP-1, DNA hasarlarında devreye girerek DNA tamirini gerçekleştirirken, yüksek miktardaki DNA hasarı PARP-1 aktivasyonunu tetikleyerek PARP-1'in hücredeki substratı olan NAD'ın hücrede tükenmesine sebep olur. Bu durumda NAD'ın yeniden sentezlenmesi için ATP kaybına neden olarak hücrenin enerji kaybından dolayı ölümüne sebep olmaktadır (43).

PARP-1, DNA kırıkları ve DNA kırıklarının uzaysal onarımında anahtar bir role sahip olup bu kırıkların tanımlanmasında rol alan moleküler algılayıcıdır. Oldukça iyi korunmuş çok işlevsel bir enzim olup, katalitik faaliyet, DNA kırıklarının üzerinde 500'den fazla katlantı ile ortaya çıkar. Bu fiziksel birliktelik boyunca DNA metabolizması ve kromatin yapısı, PARilasyon ve yardımcı proteinler (histonlar, HMG proteinleri, topoizomeraz I ve II, DNA helikaz, tek zincir kırık

onarımı proteinleri (SSBR), baz çıkarım onarımı proteinleri (BER) ve çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir (40).

2.12.3. Poli(ADP-Riboz)ilasyonun Oksidatif Stres İle Olan İlişkisi

Çok hücreli canlıların hücreleri, sürekli olarak, DNA hasarı ile sonuçlanan endojen ve ekzojen etkilere maruz kalır. Hücreler, DNA hasarına yanıt olarak genomlarını koruyan karmaşık mekanizmalara evrimleşmişlerdir. DNA hasar yanıtı, çoklu hücrel süreçleri; DNA hasarını algılama, belirleme ve tamirin yanı sıra kontrol noktası aktivasyonu, lokal transkripsiyonal bariyeri, kromatin oluşumu ve hücre ölümü uyarımını kapsar (44).

PARilasyon reaksiyonu oksidatif hasar sonucu oluşan DNA hasarı, hücre ölümüne karşı oluşturulan hücrel bir cevaptır. Oksidatif hasar sonucu oluşan DNA kırıklarının poli ADP-ribozillenmesinde en etkin rolü üstlenen PARP ailesi üyesi enzim, PARP-1'dir (45). PARP-1, hasar gören DNA'da fark edilen ilk proteinlerden biridir (44). PARP-1 reaksiyon boyunca NAD'dan riboz parçaları alarak 200 birimden daha uzun homopolimerler sentezler. Reaksiyon sonunda bu polimerler poli (ADP-riboz)glikohidrolaz (PARG) enzimi tarafından yıkılır. PARP-1, NAD'ı substrat olarak kullanarak kendisi de dâhil olmak üzere çeşitli proteinlerin glutamik asit, aspartik asit ve lizin rezidülerini poli ADP-riboziller. Poli ADP-ribozillenme, proteinlerin konformasyonunu değiştirerek DNA ile olan bağlantılarını düzenler. DNA kırıklarına bağlanan PARP-1, böylelikle kendisinin ve diğer DNA tamir mekanizması proteinlerinin aktivasyonunu sağlayarak, DNA'yı parçalanmaktan korur ve DNA tamirini başlatır (45).

PARP-1, yapısal olarak ifade olduğunda, özgün olma yeteneği, DNA zincir kırıklarını alkilleyici ajanlar, oksidantlar ve iyonize radyasyonun neden olduğu DNA hasarına hızlı ve şiddetli bir hücrel yanıtla PARilasyon, DNA zincir kırıklarının düzeltilmesi ile harekete geçer. Tek ve çift zincir DNA hasarı olmadığında, PARilasyon seviyesi düşüktür fakat DNA hasarı olduğunda 100 kat kadar daha fazla olabilir. Bu şartlar altında PARP'ın yaklaşık % 90'ı, PARP-1 tarafından sentezlenir (39).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bu çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi (BEÜ) Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, BEÜ Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı ve BEÜ Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nin katılımları ile yapılmıştır. Çalışma için BEÜ Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 31.08.2012 tarihinde 2012-16-28/03 numaralı etik kurulu onayı alınmıştır.

Çalışmamızda, BEÜ Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde üretilen, 12-14 haftalık, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen 40 adet genç erişkin Wistar albino dişi sıçan kullanıldı. Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip deneklerden, vücut ağırlıkları birbirine yakın olanlar aynı grupta olacak şekilde; biri kontrol 3'ü deney grubu olmak üzere toplam 4 grup, Tablo 1'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 yemlerle beslendi.

Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu;

- I. Grup (n=10):** Işınlama ortamına götürülen ancak ışın uygulanmayan, deney süresince oral yoldan çeşme suyu uygulanan, kontrol grubu.
- II. Grup (n=10):** Işınlama ortamına götürülen ancak ışın uygulanmayan, deney süresince oral yoldan 100 mg/kg curcumin uygulanan, curcumin grubu.
- III. Grup (n=10):** 8.3 Gy tek doz tüm vücut X ışını alan ve ışınlamadan sonra 4. günde sakrifiye edilen, oral yoldan da çeşme suyu uygulanan, radyasyon grubu.
- IV. Grup (n=10):** 8.3 Gy tek doz tüm vücut X ışını alan ve ışınlamadan 1 hafta önce başlayıp ışınlamadan sonra 4. günde yapılan sakrifikasyona kadar gün aşırı oral yoldan 100 mg/kg curcumin uygulanan, radyasyon+curcumin grubu.

Tablo 1. Deney Grupları ve yapılan işlemler.

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Radyasyon	-	-	8.3 Gy	8.3 Gy
Curcumin	-	100 mg/kg (Oral)	-	100 mg/kg (Oral)
Çeşme Suyu	Oral	-	Oral	-

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

Radyasyon hasarı oluşturmak amacıyla BEÜ Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda, kontrol grubu ve curcumin 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, nötral formalin ile tespit edildi. Nötral formalin ile 2 gün tespit edildikten sonra dokular 1 gün süre ile akar çeşme suyunda yıkama işlemine alındı. Su ile yıkama işleminin ardından dokular dehidratasyon için, 1 gün süre ile % 70'lik alkolde ve artan alkol serilerinde (%70, 90, 96, 100) 1'er saat tutuldu. Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma işlemi için dokular 3 seri 15'er dk ksilol ile muamele edildi. Gömme işleminden önce dokular yumuşak parafinde 1 gece bekletildi. Bir sonraki gün ovaryum dokuları, Bio Optica marka parafin dispenser ile bloklandı. Hazırlanan parafin bloklardan, Shandon Finesse 325 marka silindirik 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 yoğunluğunun değerlendirilmesinde kullanılacak kesitler belirlendi. Bu kesitler ovaryum dokusunun genel özelliklerini ortaya

koyabilmek için Hematoksilen-Eozin (H-E) ve Periyodik Asit Schiff-Hemalen (PAS-HL) boyları 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 2'de belirtildiği gibi yapıldı.

Tablo 2. Ovaryum Kesitlerindeki Folliküllerin Sınıflandırılması (46).

Follikül	Morfolojik Özellikleri
Primordiyal Follikül	ZP'sız oositler etrafında tek tabaka yassı, granüloza progenitor hücrelerine sahip follikül.
Primer Follikül	Oositler etrafında bir ya da birden fazla tabaka kübik granüloza hücreleri bulunan follikül.
Sekonder Follikül	Oositler etrafında 2 ya da daha fazla granüloza hücre tabakası bulunan ve granüloza hücreleri arasındaki boşluklarda follikül sıvısı birikimi başlamış follikül.
Tersiyer (Graaf) Follikül	Tek ve büyük bir boşluğa (antrum) sahip olup, sayısı azalan granüloza hücrelerinin follikül sıvısı ile dolu bir antrumu çevrelemekte olduğu, oositin ise kümülüs olarak bilinen granüloza hücreleri tarafından çevrelenmiş olduğu follikül.

3.2. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Radyasyona bağlı ortaya çıkan DNA hasarının göstergesi olarak ovaryum dokusunda DNA onarıcı bir enzim olan PARP-1 ifadesi immünohistokimyasal yöntemler ile gösterildi.

İmmünohistokimyasal inceleme için ovaryum dokusundan 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve deparafinizasyon işlemini takiben kesitler suya indirildi. Suya indirilen kesitler antijenik determinant bölgelerinin açığa çıkarılması amacıyla sitrat tamponu (pH=6.0) içerisinde mikrodalga fırında 5 dk kaynatıldı. Oda ısısında 10 dk soğumaya bırakıldıktan sonra kesitler fosfat tamponu PBS (PBS; pH 7.6) ile yıkandı. Bu aşamadan sonra endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için metanolde hazırlanan %3'lük H₂O₂ ile 15 dk muamele edildi. Distile sudan geçirilen kesitler PBS ile yıkandı. Spesifik olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere kesitlere

%1 preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB) uygulandı. Daha sonra kesitler nemli kabin içinde 1/100 oranında sulandırılmış primer antikor (Rabbit polyclonal IgG PARP-1, ab6079, Santa Cruz Biotechnology, USA) ile 1 saat süre ile inkübe edildi. Kesitler 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 30 dk sekonder antikor solüsyonunda (Biotinylated Link, Dako, K0609) tutuldu. 3 kez PBS'de yıkanan kesitlere 10 dk streptavidin peroksidaz solüsyonu (Streptavidin HRP, Dako, K0609) uygulandı. Kesitlere 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 3 dk Diaminobenzidin (DAB) kromojen solüsyonu (Vector, SK-4100) uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 30 sn Mayer's hematoksilen uygulanarak zıt boyama yapıldı. Akar su altında, 5 dk yıkanan kesitler kapatma solüsyonu konarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda değerlendirmeye alındı.

3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler Medyan (Q1-Q3) olarak ifade edildi. Dört grubun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis varyans analizinde alt grupların ikişerli karşılaştırılması ise Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Tekrarlı ölçümlerin değerlendirilmesinde ise Friedman testinden faydalanıldı. Alt grupların ikişerli karşılaştırılması Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon testi ile yapıldı. Sonuçlar % 95 güven aralığında değerlendirildi ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Kontrol Grubuna Ait Mikroskopi Bulguları

Kontrol grubuna ait ovaryumların korteks bölgelerini en dıştan çevreleyen germinal epitel genellikle tek tabakalı kübik hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. Tunika albuginea'nın germinal epitelin altında yoğun bir bağ doku tabakası olarak süreklilik gösterdiği tespit edildi. Tunika albuginea tabakasının hemen altında yerleşim gösteren gelişimin farklı aşamalarındaki folliküller görüldü. Özellikle ZP'sız oositler etrafında tek tabakalı ve genellikle 4-6 yassı, granüloza progenitor hücrelerine sahip primordiyal folliküller gruplar halinde ovaryumun korteks bölgesinde yerleşmişlerdi. Belirgin bir çekirdeğe sahip oosit ile aralarında boşluk gözlenmeyen granüloza hücreleri ve oositi çevreleyen, ZP'dan oluşan primer folliküller ya tek tabakalı ya da çok tabakalı olarak kolaylıkla seçilebildi. Genellikle büyük ve geniş bir antrum boşluğuna sahip antral folliküllerdeki kumulus ooforus denilen; primer oosit, zona pellusida ve ZP'yi çevreleyen corona radiata'yı kapsayan granüloza hücreleri açık bir şekilde gözlemlendi (Şekil 8-9).

Ovaryum kesitlerinde farklı aşamalarındaki korpus luteum yapıları incelendi. Gelişmekte olan folliküllerde, 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 farklılaşmış idi. Avasküler karakterdeki follikülün beslenmesini sağlayan kan damarları teka tabakasında görüldü.

Ovaryum follikülleri ve korpus luteumlar arasında bağ dokusu karakterindeki stromanın yer aldığı tespit edildi. Atreziye uğramış büyük çaplı folliküllerin, teka hücrelerinin farklılaşmasıyla oluşan interstisyel bezler, merkezi yerleşimli büyük nükleuslara sahip olup, polihedral şekilleri ile kolayca ayırt edilen hücrelerden oluştuğunu gözlemlendi.

Sağlıklı folliküllerin yanı sıra doğal fizyolojik süreç içerisinde atreziye uğrayarak elemine edilen dejenere olmuş atretik folliküller fark edildi. Bu folliküller genellikle granüloza hücrelerindeki piknotik çekirdeklerin varlığı ile ayırt edildi. İlave olarak, oosit fragmentasyonu, oosit granüloza hücreleri arasında kopmalar ve granüloza hücre tabakaları arasında çok sayıda piknotik çekirdek gözlemlendi.

Kontrol grubunda H-E boyamasının yanı sıra yapılan PAS- HL boyaması ile farklı aşamalarda sağlıklı folliküller izledik. Gelişmekte olan folliküllerde PAS (+) boyanan ZP ve bazal membranı net bir şekilde ayırt edildi (Şekil 10).

4.2. Curcumin Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular

Deney süresince oral yoldan oral olarak curcumin alan ve iyonize radyasyona maruz kalmayan curcumin grubundaki deneklerimizden alınan kesitlerin ışık mikroskopik incelemesi sonucunda, kontrol grubuna benzer bir şekilde, gelişimin farklı aşamalarına ait normal yapıdaki follikülleri gözlemledik (Şekil 8-9). Curcumin grubu ile kontrol grubunun farklı gelişim evrelerindeki sağlıklı follikül sayılarının benzer olduğunu gözlemledik (Tablo 3).

4.3. Radyasyon Grubuna Ait Mikroskopi Bulguları

İyonize radyasyon maruziyetinden 4 gün sonra alınan ovaryum doku kesitlerinde kontrol grubundan farklı olarak, atretik dejenerasyonların oldukça yaygın olduğunu gözlemledik. Kortekste yerleşik farklı gelişim aşamalarındaki follikülleri gözlemledik. Daha çok primer folliküllerin normale yakın bir görünümde oldukları fark edildi.

Kontrol grubuyla benzer şekilde ovaryumu çevreleyen germinal epitelini oluşturan hücrelerin tek katlı kübik epitel karakterinde olduğunu tespit ettik. Kontrol grubunda çoğunlukla kortekste yer alan gelişimin farklı aşamasındaki sağlıklı folliküllerin radyasyon alan grupta yerini atretik folliküllere bıraktığını gözlemledik (Şekil 9). Atretik follikül sayısını kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda anlamlı düzeyde ($p<0.001$) fark olduğunu tespit ettik (Tablo 3). Küçük büyütmede yaptığımız incelemelerde gelişimin farklı aşamalarındaki folliküllerin neredeyse tamamının atretik olduğunu gözlemledik (Şekil 8). Germinal epitel altında yer alan kortekste, neredeyse hiç bir primordiyal folliküle rastlamadık (Şekil 9). Kortekse yakın yerleşim gösteren bazı primer follikülleri tespit ettik. Antral folliküllerde ileri atretik değişiklikler gözlemledik. Follikül sayılarını incelediğimizde özellikle primordiyal ve primer follikül evresindeki sayının kontrol ve curcumin grubuna oranla anlamlı düzeyde ($p<0.001$) düştüğünü gözlemledik.

Atretik folliküllerde meydana gelen değişiklikleri; genellikle çok sayıda piknotik çekirdekli granüloza hücreleri, antral boşluktaki apoptotik cisimcikler,

granüloza hücreleri ile oosit arasındaki ayrışmalar, granüloza hücrelerindeki sitoplazmik kayıplar, hücrelerde vakuolizasyon, oosit morfolojisinde bozulmalar, oosit çekirdeği dejenerasyonu ve teka tabaka hipertrofisi olarak gözlemledik (Resim 9).

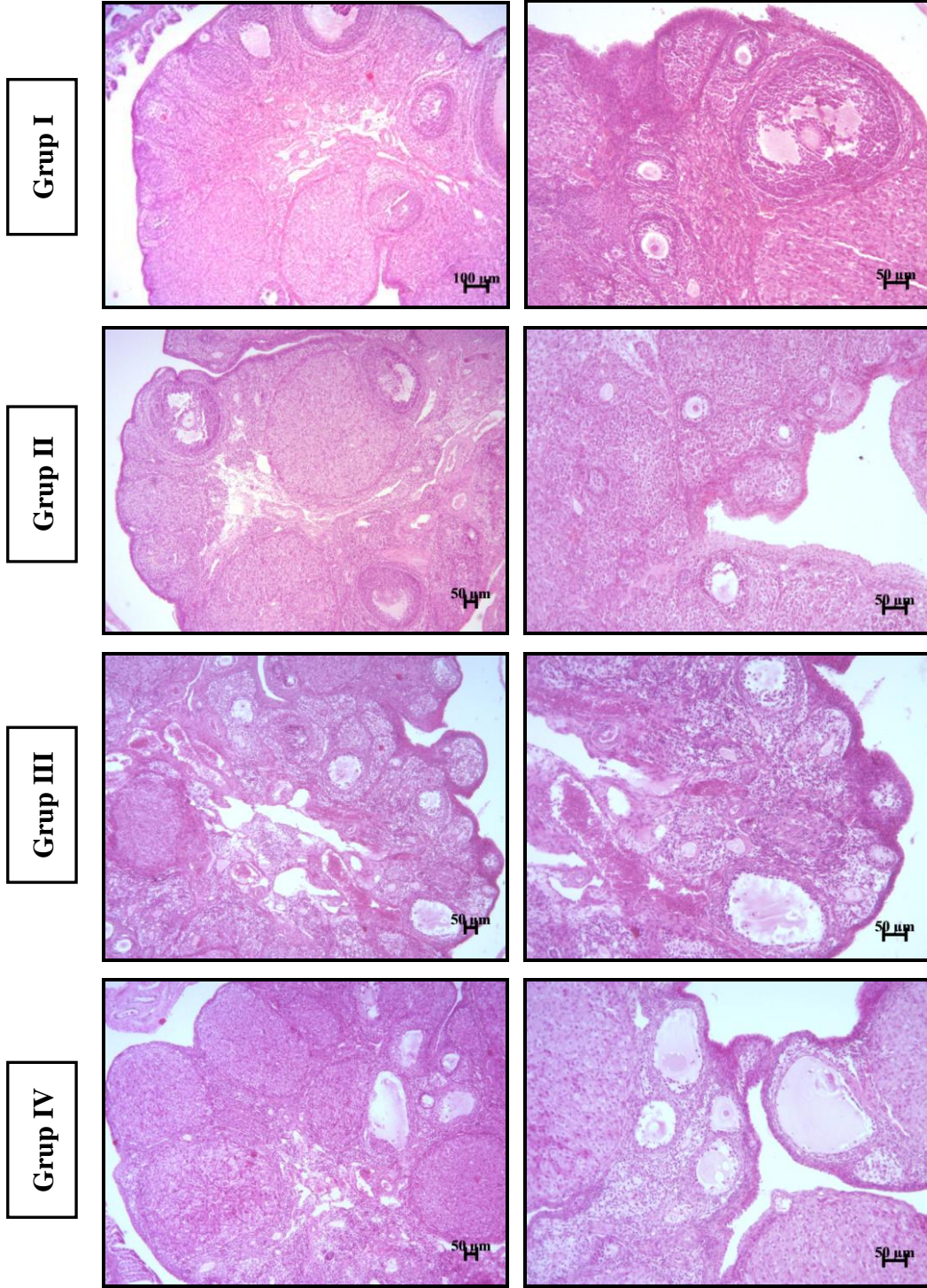
Oosit nükleusunda birçok fragmantasyonun yer almakta olduğunu fark ettik. Bazı folliküllerde oosit sitoplazmasının asidofilik bir hal aldığını gözlemledik. Bazılarında ise granüloza hücre tabakasının, teka tabakasından ayrıldığını tespit ettik.

PAS-HL ile boyanmış kesitlerde yapılan mikroskopik incelemelerde ise bazı folliküllerde oositin ZP'dan ayrıldığını, ZP'nın kıvrımlı hale geldiğini ve bazılarında ZP'nın bütünlüğünü kaybettiğini gözlemledik (Şekil 10C). Atrezi aşamasındaki folliküllerde PAS (+) boyanmış, fragmente ve büyük vakuoller içeren oositler tespit ettik. Antral folliküllerin granüloza hücreleri arasında PAS (+) boyanan hücreler artıklar, granüloza hücreleri ile ZP arasında boşluklar olduğunu gözlemledik (Şekil 10C).

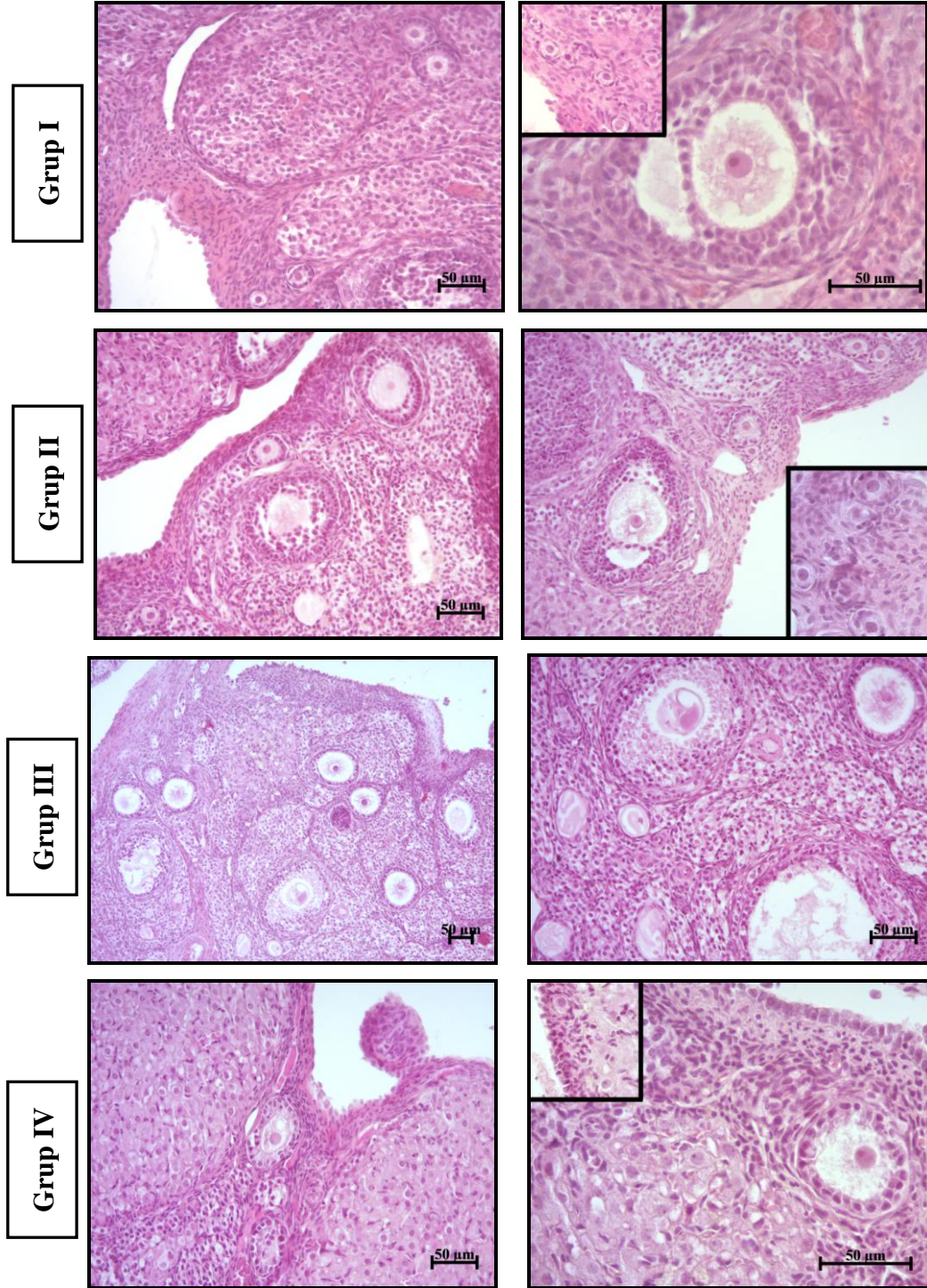
4.4. Radyasyon+Curcumin Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular

İyonize radyasyona maruz kalınmadan bir hafta önce başlayan ve ışınlamadan sonraki 4. güne kadar curcumin alan gruptaki deneklerimizin ovaryum dokusu ışık mikroskobu ile incelediğimizde; sadece iyonize radyasyon alan tedavisiz grupta görülen folliküler atrezi ve dejenerasyon oranının, bu grupta curcumin tarafından kısmen önlensede aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını tespit ettik. (Tablo 3). Ovaryum korteksinde farklı aşamalarda çeşitli sağlıklı folliküller tespit ettik. Özellikle primordiyal follikül sayısının sadece radyasyon alan gruba göre anlamlı düzeydeki artışı dikkat çekiciydi ($p<0.001$) (Tablo 3).

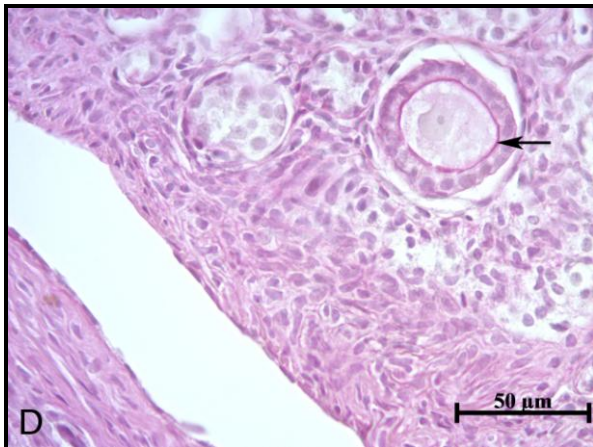
Bu gruptan alınan kesitlerde, atretik folliküllerin dejenere olan oositlerine ait bozuk morfolojili ZP'ların PAS (+) boyandığını gözlemledik. Bu folliküllerde yine çok sayıda PAS (+) boyanan granüloza hücreleri gözlemledik. Folliküllere ait granüloza hücrelerinin üzerine yerleşik olarak bulunduğu bazal membranın PAS (+) boyandığını tespit ettik (Şekil 10D).



Şekil 8. Tüm gruplara ait ovaryum kesitlerinin görüntüsü. Grup I (Kontrol) ve Grup II (Curcumin)'ye ait normal görümlü çeşitli evredeki foliküller, korpus luteumlar ve interstisyel bezler gözlenmektedir. Ovaryum dokusunun her iki grup içinde benzer yapısal özellikler içerdiği gözlenmektedir. Özellikle radyasyon uygulanan ovaryum dokusu incelendiğinde korteks bölgesinde yer alan farklı aşamalarda foliküllerin atretik süreçlerde olduğu belirgin şekilde izlenmektedir (Grup III). Rad+Cur uygulanan gruptaki (Grup IV) foliküllerinde bir kısmının atretik süreçte olduğu izlense de radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında dejeneratif değişikliklerde azalma dikkati çekmektedir (H-E).



Şekil 9. Tüm gruplara ait ovaryum kesitleri. Kontrol ve Curcumin grubuna ait histolojik kesitler incelendiğinde çeşitli evredeki sağlıklı folliküller izlenmekte. Primordiyal folliküller tunika albugeniannın hemen altında korteksde gruplar halinde yer almakta (Grup I ve Grup II sağdaki fotoğraf da inset şeklinde gösterilmiştir). Radyasyon grubunda (Grup III) atretik folliküllerin çokluğu ve primordiyal folliküllerin yokluğu dikkat çekmekte. Grup IV'te (Rad+Cur) sayıları azda olsa preantral aşamada sağlıklı folliküller gözlenmekte. (H-E).



Şekil 10. Tüm Gruplara ait ovaryum kesitlerin PAS+HL boyaması.

A) Kontrol grubuna ait fotoğrafta multilaminar bir primer follikül yer almakta. Granüloza hücrelerinde yer yer açılmaların olduğu gözlenmekte. Bu folliküldeki oositi çevreleyen Zona pellusida (ok) belirgin olarak izlenmekte.

B) Curcumin grubuna ait ışık mikroskop görüntüsünde sekonder follikülü ve follikül içerisinde yer alan oositi çevreleyen zona pellusida (ok) kontrol grubunda olduğu gibi düzenli bir yapı göstermekte.

C) Radyasyon uygulanmış gruba ait resimde sekonder folliküllerdeki zona pellusida yapısının belirgin olarak bozulduğu dikkat çekmekte (oklar).

D) Radyasyon ve sonrasında curcumin uygulanmış grubu incelediğimizde primer folliküldeki zona pellusida (ok) yapısının sadece radyasyon uygulanan gruba kıyasla daha düzgün olduğu görülmekte. PAS+HL scale bar=50µm

Tablo 3. Tüm gruplara ait farklı gelişim aşamasındaki sağlıklı ve atretik follikül sayılarının değerlendirilmesi

	Kontrol n=10	Curcumin n=8	Radyasyon n=9	Radyasyon+Curcumin n=9
Primordiyal	133 (110-220)	148.50 (63-173)	1.00 (1-11) ^a	9.00 (4-27) ^b
Primer	46.50 (18-66)	50.00 (22-87)	8.00 (3-17) ^a	12.00 (9-18) ^a
Preantral	9.00 (4-19)	9.00 (2-14)	3.00 (0-8) ^a	1.00 (0-5) ^a
Antral	7.00 (2-15)	6.00 (0-12)	0.00 (0-3) ^a	0.00 (0-1) ^a
Atretik	56.00 (28-73)	68.00 (39-82)	103.00 (67-114) ^a	98.00 (70-103) ^a

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak sunulmuştur.

$p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

^a $p < 0.001$ Kontrol ve Curcumin grubu ile kıyaslandığında.

^b $p < 0.001$ Kontrol, Curcumin ve radyasyon grubu ile kıyaslandığında.

4.5. Kontrol Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular

Morfolojik bulgularımızı, histolojik skora (H-skor) yöntemi ile semikantitatif verilere dönüştürerek, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olup olmadığını analiz ettik. Histolojik skorlamayı, folliküllerde yer alan 100 oositin çekirdeğinde PARP-1 immünoreaktivite şiddetini değerlendirerek gerçekleştirdik (zayıf:1, orta:2, kuvvetli:3).

Sıçan ovaryumunda uyguladığımız immünohistokimyasal yöntemler sonucunda gelişimin farklı aşamalarındaki çeşitli folliküllerde PARP-1'in hem oosit çekirdeğinde hem de folliküllere ait bazı granüloza hücrelerinde ifade edildiğini (zayıf-orta-kuvvetli) gözlemledik. PARP-1'in özellikle, primordiyal follikül ve primer follikül gelişim evrelerindeki oosit çekirdeğinde kuvvetli bir boyanma gösterdiğini tespit ettik (Resim 11A-11B).

4.6. Curcumin Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular

Sadece curcumin alan bu grupta, PARP-1 ifade düzeyinin kontrol grubundan daha kuvvetli olduğunu gözlemledik ($p < 0.001$). Yine PARP-1 ifadesinin özellikle,

primordiyal ve primer folliküllerde (Resim 11C-11D) daha fazla olduğunu tespit ettik (Tablo 4).

4.7. Radyasyon Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular

8.3 Gy iyonize radyasyon maruziyetine kalan deneklerin ovaryum doku kesitlerinde PARP-1 ifadesini incelediğimizde diğer 3 grup ile kıyaslandığımızda, radyasyona bağlı olarak H-skorun anlamlı ($p<0.001$) düzeyde artmış olduğunu gözlemledik (Tablo 4). Diğer gruplardan farklı olarak PARP-1 ifadesinin corpus luteumun luteal hücrelerinin çekirdeklerinde de orta şiddette olduğunu tespit ettik (Resim 11E-11F)

4.8. Radyasyon+Curcumin Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular

Radyasyon+Curcumin grubu ile kontrol grubu arasında H-skorun anlamlı bir farklılık göstermediğini tespit ettik. Ancak sadece curcumin ve sadece radyasyon uyguladığımız gruplar ile karşılaştırdığımızda H-skorun anlamlı ($p<0.001$) düzeyde farklılık gösterdiğini tespit ettik (Tablo 4). PARP-1 ifadesinin yine oosit çekirdeklerinde ve granüloza hücrelerinde olduğunu gözlemledik (Resim 11G-11H).

Tablo 4. PARP-1 immünoaktivitesi için histolojik skor değerleri.

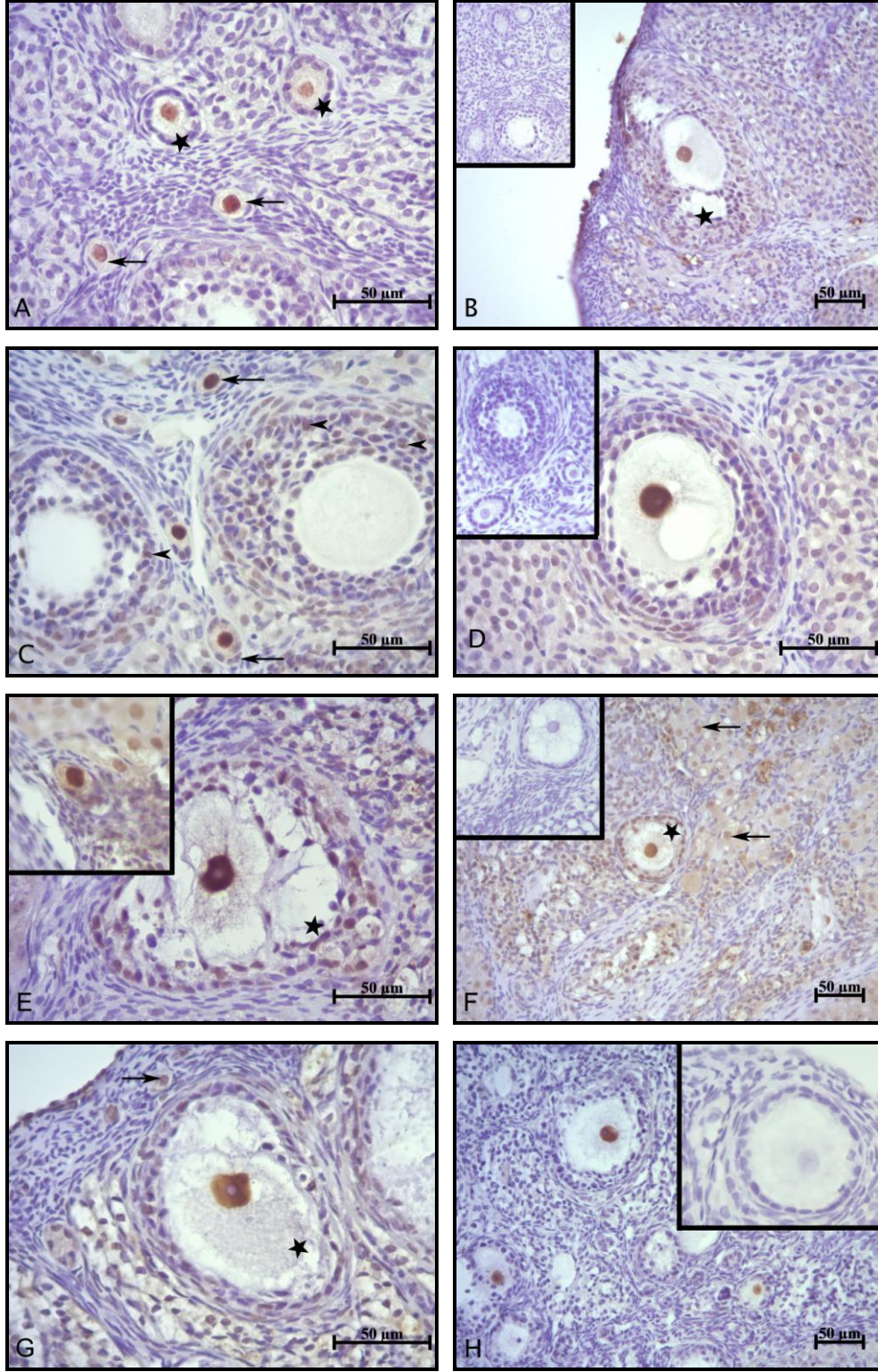
	Kontrol n=6	Curcumin n=6	Radyasyon n=6	Radyasyon+Curcumin n=6
PARP-1 için H-Skor	187.50 (184.75-194.50)	201.00 (199.50-202.50) ^b	234.00 (230.75-237.25) ^a	193.00 (190.50-195.50)

Veriler ortanca (25-75 persantil) olarak sunulmuştur.

$p<0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

^a $p<0.001$. Kontrol, curcumin ve radyasyon+curcumin grubu ile kıyaslandığında.

^b $p<0.001$. Kontrol, radyasyon ve radyasyon+curcumin grubu ile kıyaslandığında.



Şekil 11. Sıçan ovaryum dokusunda PARP-1 ifadesinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. Kontrol grubuna ait fotoğrafta (A) Primordiyal (oklar) ve primer folliküllerin oosit çekirdeklerinde PARP-1 ifadesi belirgin olarak izlenmekte. Yine kontrol grubuna ait resimde (B) sekonder folliküle ait pozitif immünoreaktif gözlenmekte. Curcumin grubuna (C) ait kesitte pozitif reaksiyon gösteren folliküller ve granuloza hücreleri (ok başı). (D) curcumin grubuna ait artık sekonder folliküle dönüşen oositin çekirdeğinde kuvvetli PARP-1 ifadesi görülmekte. Radyasyon grubuna ait sekonder folliküle (yıldız) şiddetli reaksiyonun yanı sıra luteal hücrelerde de belirgin bir immünoreaktivite fark edilmekte (inset) (E ve F). Radyasyon+curcumin grubunda primordiyal folliküle (ok) sekonder folliküle (yıldız) pozitif reaksiyon izlenmekte (G). Radyasyon+Curcumin grubuna ait parp-1 ifadesi (H). Sağ sütundaki resimler içerisinde yer alan kutulardaki resimler gruplara ait negatif kontrolleri göstermekte.

4.9. Deneklerin Total Vücut Ağırlığında ve Ovaryum Ağırlığında Meydana Gelen Değişiklikler

Deneyin başlangıcında, radyasyon uygulamasından 24 saat sonra ve sakrifikasyondan hemen önce tartılan deneklerin ağırlıkları istatistiksel olarak analiz edildiğinde, tüm gruplarda kendi içinde 3 farklı zaman diliminde ölçülen ağırlıkların anlamlı düzeyde farklılık gösterdiğini saptadık ($p=0.003$). Son ağırlık bakımından gruplar arasındaki fark anlamlı ($p<0.001$). Kontrol ile curcumin grubu ve radyasyon ile radyasyon+curcumin grubu kendi içlerinde benzer bulunurken diğer tüm karşılaştırmalar birbirlerinden farklı bulunurken ($p<0.001$) diğer karşılaştırmalar anlamlı bulunmadı. Tüm vücut radyasyon uygulanan deneklerin total ağırlığında azalma olduğu, buna keza, deneklerin deney süresince ağırlıklarında meydana gelen doğal artıştan dolayı, grup içi ağırlık değişikliklerinde anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5).

Tüm vücut ışınlamaya bağlı olarak ovaryum ağırlığı bakımından gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmadı (Tablo 5).

Tablo 5. Deney süresince total vücut ağırlığında ve ovaryum ağırlığında gözlenen değişiklikler.

	Kontrol n=10	Curcumin n=8	Radyasyon n=9	Radyasyon+Curcumin n=9
Başlangıç denek ağırlığı	196.50 (191-208)	183.50 (174-210)	211.00 (177-230)	205.00 (192-206)
Işınlama sonrası denek ağırlığı (1. Gün)	208 (200-226)	201 (184-230)	214.00 (187-236)	208.00 (200-220)
Sakrifikasyon denek ağırlığı	217.5 (212-244)	212.00 (191-235)	183.00 (170-205) ^a	180.00 (163-190) ^a
Ovaryum ağırlığı (gr)/100gr vücut ağırlığı	0.0209 (.0164-0.0285)	0.0242 (0.0171-0.0291)	0.0231 (0.0163-0.0275)	0.0208 (0.0144-0.0238)

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak sunulmuştur.

$p<0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

^a $p<0.001$ Kontrol ve Curcumin grubu ile kıyaslandığında (Başlangıç denek ağırlığına ve ışınlama sonrası denek ağırlığına göre).

5. TARTIŞMA

Memelilerde reproduktif dönem süresince, ovaryum folliküllerin pek çoğu atrezi olarak isimlendirilen ve folliküllerin dejenere olması ile sonuçlanan bir sürece maruz kalmaktadırlar (47). Doğal olarak gerçekleşen folliküler atrezinin mekanizması hala tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Folliküler atreziiyi hızlandıran atretojenik uyarılardan birisi de modern tıbbın integral bir parçası olan ve diagnostik amaçların yanı sıra terapötik amaçlar için de kullanılan iyonize radyasyondur (47,48).

Radyasyonun, genç erişkinlerde pelvisi kapsayan bir alanda, devam eden üreme fonksiyonları üzerine olumsuz bir etkisinin olduğu iyi bilinir (49). Özellikle yüksek doz radyoterapi, kanserli genç hastaların sağkalımını uzatır ancak ovaryum işlevini etkileyerek ovaryum yetmezliği, adet görmeme, erken menapoz ve infertiliteye yol açabilir (50,51).

Düşük dozlarda ise iyonize radyasyonun canlılarda oluşturacağı sağlık sorunlarının çeşitliliği ve boyutları hususunda gerçekçi bir tahminde bulunulamayışı esas olarak çevre koşulları, diyet ve canlılar arasındaki biyolojik değişkenlik gibi bir takım faktörlerden kaynaklanabilmektedir (52).

Düşük doz radyasyon bir mitojen olarak rol alabilmekte ve hatta çift zincir DNA kırıklarında tamir mekanizmaları aktive olmamakta ve bu da mutasyonların oluşmasına yol açmaktadır (53).

Thibaud ve ark. (54) puberteden önce tek doz verilen ≤ 10 Gy tüm vücut ışınlanmanın yüksek ovaryum yetersizliğe (%55-80) neden olduğunu, fakat fraksiyonlu tüm vücut ışınlamaların daha yüksek dozlarda bile ovaryumlara karşı daha az toksik etki bıraktığını göstermişlerdir. 25 yaşından sonra yapılan tüm vücut ışınlamalar ovaryumlarda daha fazla toksik etki bırakmaktadır.

Bazı vakalarda, radyasyonun belki de kanserin en iyi tedavi edici yöntemi olabileceği düşünülmüştür. Malign hücrelerin yok olmasının yanı sıra normal hücrelerde hasarla sonuçlanan radyoterapi ağır yan etkilere sahiptir. Radyasyonun olumsuz biyolojik etkileri, hücre hasarının oluşması ve zararlı sitotoksik etkilere neden olan oksidatif stres ile birlikte ortaya çıkan H_2O_2 , OH^- ve $O_2^{\cdot-}$ 'u kapsayan ROT'un üretimidir (48, 55).

Radyasyon hasarını engellemek için sistemler üzerinde çeşitli antioksidanlarla birçok çalışma yapılmıştır. Antioksidan savunma sistem seviyeleri ve ROT ürünleri

arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkan oksidatif stresin oluşturacağı hasarı engellemek için melatonin, taurin, hipotaurin, glutatyon, vitamin A, C ve E gibi çeşitli antioksidanlar önerilmiştir (48,56,57,58). Bunlara ilave olarak, radyasyonun zararlı etkilerinden hücreleri koruduğu birçok çalışmada ispatlanan curcuminin radyoprotektif özelliği ve önemli fitokimyasallardan biri olması onun radyomodifiye bir ajan olarak kabul edilmesini sağlamaktadır (59). Rapor edilen çalışmalara rağmen literatür taramasında curcuminin ovaryumda iyonize radyasyona karşı radyoprotektif etkisini gösteren çalışmalar çok sınırlıdır.

Ovaryum follüküleri dikkat çekici bir şekilde DNA hasarına neden olan iyonize radyasyona karşı oldukça hassastır. Çalışmaların birçoğunda radyoterapiyi takiben ovaryum histolojisi ışık mikroskopisi düzeyinde incelenmiştir (54). İncelemeler sonunda dejenere olan follüküller; piknotik çekirdekli granüloza hücreleri, teka tabakası hipertofisi, bazal membran ayrışması ve ondülasyonu gibi morfolojik özellikler göstermişlerdir (60).

Kim ve Lee'nin (61) yaptıkları bir çalışmada farelere çalışmamıza benzer biçimde 8.3 Gy iyonize radyasyon uygulamışlar ve radyasyondan sonraki 2, 8 ve 14. saatlerde ovaryumlar alınarak follikül oranlarını göstermişlerdir. Kontrol grubunda sağlıklı primordiyal follikül oranı % 61.6 iken radyasyon uygulanan gruplarda bu değerler; 2, 8 ve 14. saatlerde sırasıyla % 51.6, 11.1 ve 7.1'e düştüğünü bildirmişlerdir. Primer follüküllerde bu değerler; kontrol 2, 4 ve 14. saatlerde sırasıyla % 82.5, 80, 45,5 ve 33.3, preantral ve antral follüküllerde ise % 31'i sağlıklı iken 2, 4 ve 14. saatlerde sırasıyla % 15.9, 7.5, ve 1.6'ya düştüğünü rapor etmişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada benzer şekilde sadece radyasyon uyguladığımız gruptaki primordiyal ve primer follikül sayının azalması dikkat çekiciydi.

Lee ve ark. (62) yaptıkları bir çalışmada sıçanları 8.0 Gy, fareleri ise 7.2 Gy tüm vücut γ radyasyon ile ışınlanmışlardır. Radyasyondan sonra 0, 4 ve 8. günlerde ovaryum dokuları alınarak ovaryum follüküllerindeki atrezi oranını ve radyasyona bağlı olarak değişen morfolojik özelliklerini göstermişlerdir. Atretik follüküller; teka hücre tabakası hipertrofisi ve granüloza hücrelerindeki piknozis bulguları esas alınarak değerlendirilmiştir. Işınlamadan sonra 4. günde fareler ve sıçanlardan alınan ovaryumlardaki atretik follikül yüzdesi, 0. günde alınan ovaryumlardaki follüküller atreziye göre yüksek bulunmuştur. 8. günde alınan ovaryumlardaki atretik follikül oranı ise diğer gruplara göre önemli bir artış göstermemiştir. 4. günde alınan ovaryumlarda sağ kalım gösteren granüloza hücrelerinin yüzdesi kontrol grubuna

göre düşüktü, ancak 8. günde hayatta kalan granüloza hücrelerinin yüzdesinin kontrol grubu yüzdesine ulaşmış olduğu gösterilmiştir. Yüksek doz radyasyonun etkisiyle ovaryumda atretik folliküllerin baskın bir şekilde görüldüğü bu çalışma ile de gösterilmiştir. Çalışmamızda da atretik follikül sayısının sadece radyasyon uyguladığımız grupta kontrol ve curcumin grubuna göre anlamlı düzeyde artmış olduğunu gösterdik.

Aktaş ve ark. (25) yaptıkları bir çalışmada dişi farelere 8.3 Gy tüm vücut iyonize radyasyon uygulamışlar ve ışınlamadan sonraki 3 ve 12. saatlerde ovaryum dokularını alarak atretik follikül değerlendirmesi yapmışlardır. Işınlamadan sonraki 3. saatte alınan ovaryumlarda erken atrezik özellik gösteren folliküller ile antrum ve folliküler duvardaki apoptotik hücrelerin sayısının oldukça fazla olduğunu göstermişlerdir. Diğer bir taraftan, ışınlamadan sonraki 12. saatte toplanan ovaryumlar ile 3. saatte toplanan ovaryumlar karşılaştırıldığında ileri atretik özelliklere sahip apoptotik hücreler içeren folliküllerin sayısının önemli derecede yüksek olduğunu rapor etmişlerdir .

Lee ve ark. (47) yapmış oldukları bir çalışmada 3 haftalık farelere 8.3 Gy tüm vücut iyonize radyasyon uygulamışlar ve ışınlamadan sonraki 3, 6 ve 12. saatlerde ovaryum dokularını alarak hazırlanan en geniş yüzeyli kesitlerde primordiyal ve primer folliküllerin morfolojik değişimlerini ve atretik follikül oranını göstermişlerdir. Kontrol grubunda sağlıklı primordiyal follikül oranı; % 62.5 iken 3, 6 ve 12. saatlerde sırasıyla % 49, 11.1 ve 7.1 olduğunu, primer folliküllerde ise kontrol grubunda % 81.3 iken 3, 6 ve 12. saatlerde sırasıyla % 75, 45.5 ve 33.3 olduğunu bildirmişlerdir. Işınlamadan sonraki kısa zaman periyodunda, radyasyonun neden olduğu morfolojik değişiklikler, primordiyal folliküllerin primer folliküllere göre radyasyona karşı daha hassas olduğunu göstermiştir.

Mole ve Papworth (63) ise yüksek doz radyasyonun etkisiyle ovaryumda atretik folliküllerin baskın bir şekilde görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Nishida (64) yapmış olduğu 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 kurbanı olarak ovaryumları alınmıştır. Alınan ovaryumlar ışık mikroskopisi altında incelenmiş ve ışınlamadan iki hafta sonra alınan ovaryumlarda primer folliküller neredeyse görülmemiştir. Graaf follikülleri ise atretik folliküllere dönüşmüştü. Bazı folliküllerin oositleri çok geçmeden yok olurken, ZP buruşmuş ya da parçalanmıştı. Diğer folliküllerin çoğu

radasyona yüksek bir dereceye kadar direnmiş fakat granüloza hücrelerinin sitoplâzmalarındaki depozisyon ile yok olmaya başlamışlardı. Işınlamadan sonraki beşinci hafta ovaryumlardaki bütün folliküller yalnızca ZP kalıntıları içeren atretik folliküllere dönüşmüşlerdi. Işınlamanın 6-7. haftasında ise interstisyel hücreler artık bütün ovaryumda görülmekteydi. PAS+HL ile boyadığımız radyasyon grubuna ait kesitlerde de benzer biçimde morfolojik değişiklikler tarafımızdan gösterilmiştir.

Ovaryumların radyasyona maruz kalması sonucu öncelikle oositler etkilenmektedir. Primordiyal folliküllerde yer alan oositler, olgun folliküllerdeki oositlerden daha radyosensitiftir. Genç hastalar daha fazla primordiyal follikül rezervine sahip olduğu için rezidüel ovaryum fonksiyonunun korunması daha önemlidir. Ovaryum follikülleri proliferatif faz sırasında daha radyosensitifken siklusun sonunda daha az duyarlıdır. Diğer önemli bir faktör ise hücre membran direncidir. Oosit membranı radyasyona daha az duyarlı membranlar arasındadır (51).

Türler arasındaki oosit radyosensitivitesi son derece farklıdır. Fare oositlerinin (LD_{50} : 0.15 Gy), maymun oositlerinden (LD_{50} : 50 Gy) 350 kat daha hassas olduğu belirtilmiştir. İnsan oositlerinin radyosensitivitesini anlamak, ovaryum yetersizliğini erkenden tahmin edebilmek için çok önemli bir avantaj sağlayacaktır (49).

İyonize radyasyon, suyun radyolizisi ile aktive olan serbest radikal türlerine ya da DNA ile doğrudan etkileşim boyunca çoklu biyolojik etkilere yol açmaktadır (2). Su içeriği yüksek olan dokularda iyonize radyasyonun etkileri özellikle su molekülleri üzerinden gelişmektedir. Su molekülünün radyolizisi; H_2O_2 ve H_2 gibi moleküllerin ve aynı zamanda H^{\cdot} , OH^{\cdot} , HOO^{\cdot} ve O_2^{\cdot} gibi yüksek aktiviteli radikallerin oluşumuna sebep olmaktadır. Serbest radikaller hücrenin genetik materyalinde de bir takım ciddi değişikliklere yol açmaktadır. Örneğin serbest radikallerin etkisiyle, nükleik asitlerin yapısındaki hidrojen bağları ile baz-şeker molekülleri arasındaki bağlar kopabilmekte, şeker molekülleri okside olabilmekte, nükleotid zinciri kırılabilmekte ve terminal fosfatlar serbestleşebilmektedir (52).

Serbest radikal ürünlerinin etkisizleştirilmesi, hedef moleküllere hidrojen atomu bağlanması, karışık disülfid bileşiklerinin oluşumu, hücre bölünmesinin yavaşlatılması ve dokularda hipoksi gelişiminin uyarılması şeklinde tanımlanan radyoprotektif etki mekanizmaları sayesinde gerçekleşebilmektedir. Serbest radikallerin etkisizleştirilmesi süreci; OH^{\cdot} , HOO^{\cdot} ve O_2^{\cdot} gibi radyasyon etkisiyle oluşan su metabolitlerinin, eksojen ya da endojen bir takım ajanları okside etmeleri

sonucunda diğ er hücre iç i yapılarla etkileş ime girme yeteneğ inden yoksun kararlı yapılı bileş iklerin oluş ması ş eklinde özetlenebilir. Bu mekanizma sayesinde serbest radikallerin yaş amsal öneme sahip hücresel moleküller üzerindeki etkisi büyük ölçüde sınırlandırılmaktadır (52).

Aktaş ve ark. (25) yaptıkları bir ç alışmada dişi farelere 8.3 Gy tüm vücut iyonize radyasyon uygulamadan 10 gün önce baş layarak oral yoldan 100 mg/kg curcumin vermiş ler ve curcumin tedavisi sonucunda ovaryum folliküllerinde radyasyona bağı lı olarak oluş an apoptoziste, curcuminin folliküler atreziyi engellediğini ve hücreleri önemli ölçüde koruduğunu göstermiş lerdir.

Inano ve ark. (65) yapmış oldukları bir ç alışmada gebeliklerinin 20. gününde bütün sıç anları tüm vücut 2.6 Gy γ ış ını ile ış ınlamış lar ve laktasyondan sonra sıç anları iki gruba ayırıp bir yıl süre DES (Diethylstilbestrol) iç eren yemlerle besleyerek meme tümörü modeli oluşturmuş lardır. Oluşturulan iki gruptan biri günlük % 1 curcumin iç eren yemlerle beslenmiştir. Ç alışma sonucunda günlük curcumin takviyesi yapılan grupta, meme tümörü oranının diğ er grupla kıyaslandığında, % 28 oranında azaldığı rapor edilmiştir. Curcumin alan grupta artan proliferasyon ve farklılaş ma neticesinde, meme bezlerinde oluş an morfolojik farklılıklar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında neredeyse ayırt edilememiştir.

Kanter ve ark. (10) yaptıkları bir ç alışmada deneklere 1. günden ç alışmanın sonlandığı 14. güne kadar her gün 100 mg/kg curcumin oral olarak vermiş ler ve abdominal bölgeden 15 Gy gamma radyasyon uygulamış lardır. Iş ınlamadan sonra 4. günde gerçekleştirilen sakrifikasyonla alınan jejenum örneklerindeki incelemeler sonucunda curcuminin radyasyon nedeniyle oluş an hasarları kısmen önlediğini rapor etmiş lerdir.

Akpolat ve ark. (66) yapmış oldukları bir ç alışmada deneklere ç alışmanın 1. gününden baş layarak ç alışmanın sonlandırıldığı 18. güne kadar 100 mg/kg curcuminini oral olarak vermiş ler ve ç alışmanın 10. ve 14. günlerinde abdominal olarak 5 Gy gamma radyasyon ile ış ınlamış lardır. İleumda yapılan incelemeler sonucunda radyasyon alan gruplarda villus boylarında kısalma, ileri seviyede subepitelyal boş luklar ve mitotik figürlerin yanı sıra piknotik çekirdekli ş effaf sitoplâzmalı hücreler fark edilmiştir. Curcumin tedavisi alan gruplarda ise bu hasarlarının kısmen önlediği kaydedilmiştir.

Huang ve ark. (33) yapmış oldukları bir çalışmada, curcuminin yalnızca tümörlü fare yüzdesini azaltmadığı, aynı zamanda mide ve bağırsaktaki tümör büyüklüğünü de geriletmediğini bildirmişlerdir.

Choudhary ve ark. (59) 7-8 haftalık erkek farelerle yapmış oldukları bir çalışmada oral olarak 2 hafta süresince her gün sırasıyla 5, 25 ve 50 mg/kg curcumin vermişler ve tedavinin son gününde her ikinci doz oranı için 0.027 Gy'de γ radyasyonun (0-6 Gy) farklı dozlarıyla ışınlanmışlar. Işınlamadan bir gün sonra alınan dalak ve karaciğer örneklerinde glikolaz I ve II aktivitelerini belirlemişlerdir. Sonuç olarak 4 Gy'e kadar glikolaz I aktivitesinin arttığını, glikolaz II aktivitesinin ise karaciğerde doz bağımsız durumlardaki ışınlamasının (0-6 Gy) özellikle 3 Gy'den sonra önemli bir inhibisyona neden olduğunu gözlemlemişler. Işınlamadan önce curcumin tedavisi ile karaciğerde glikolaz II aktivitesinin az ama tutarlı bir şekilde arttığını, dalakta ise glikolaz II spesifik aktivitesini hafif düzensiz olarak rapor etmişlerdir.

Srinivasan ve ark. (48) sıçan hepatosit hücrelerinden oluşan kültür hattında yaptıkları bir çalışmada, hücre gruplarına 1, 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ curcumin takviyesi yapmışlar. Bu grupları 1, 2, ve 4 Gy γ -ışını ile ışınlanmışlardır. Gamma ışınlarına maruz kalan hepatosit hücrelerinden oluşan gruplarda hücreler ciddi hasar görmüştür ve tiyobarbitürikasit seviyeleri yüksek ve farklı bulunmuştur. Curcumin tedavili gruplar ile ışınlanmış gruplar karşılaştırıldığında, tiyobarbitürikasit seviyelerinin anlamlı oranda azaldığı gözlenmiştir. Bu azalış özellikle 10 $\mu\text{g/ml}$ olan grupta oldukça belirgindir. Işınlanmış gruplardaki antioksidan enzim aktiviteleri de yine aynı şekilde azalmıştır ve curcumin tedavili gruplarda bu enzim aktiviteleri ışınlanmış gruplara oranla yüksek bulunmuştur. Işınlanmış hepatosit hücrelerinin curcuminle tedavisi lipid peroksidasyonun azalmasını neden olmuştur. Yapılan çalışmada 1 $\mu\text{g/ml}$ ve 5 $\mu\text{g/ml}$ curcumin dozları 4 Gy'lik ışınlamada yüksek derecede etkili olamamıştır. Çünkü bu konsantrasyonların, bütün serbest radikallerin ortaya çıkmasını engellemek için yeterli olmadığı öne sürülmüştür. Aksine 10 $\mu\text{g/ml}$ curcuminin ise hepatositleri radyasyona bağlı olarak oluşan serbest radikallere karşı koruduğu rapor edilmiştir.

Antunes ve ark. (67), curcuminin γ -ışınlarına maruz kalan rodent kemik iliği hücrelerinde ortaya çıkan kromozomal aberasyonları azalttığını rapor etmişlerdir. Farelerin curcumin ile tedavi edilmesi sonucunda mikronukleuslu polikromatik eritrositlerde, radyasyona bağlı kromozomal hasarları engellendiği bulunmuştur.

Curcumin gibi polifenolik bileşiklerin, radyoterapi süresince normal hücreleri koruyan antioksidan özelliklere sahip oldukları gösterilmiştir.

Thresiamma ve ark. (68) yaptıkları bir çalışmalarında, ışınlamanın neden olduğu genotoksisite üzerine curcuminin koruyucu etkisini araştırmış, farelerde tüm vücut gamma ışınlamasının yaptığı mikronukleus ve kromozomal sapmaların, oral curcumin (400 µmol/kg) verilerek anlamlı olarak inhibe edildiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda curcuminin mikronukleuslu polikromatik ve normokromatik eritrositlerin oluşumunu inhibe ettiği de tespit edilmiştir.

Curcuminin çeşitli yara modellerinde yara iyileşmesini destekleyen iyi bir antioksidan ve radyoprotektif ajan olduğu rapor edilmiştir (55).

Jagetia ve ark. (55) 8-10 haftalık farelerle yapmış oldukları bir çalışmada ışınlamadan 45 dakika önce farelere 100 mg/kg curcumin takviyesi yapmışlar ve tüm vücut 0, 2, 4, 6 ve 8 Gy ışınlamaya maruz bırakmışlardır. Yapılan incelemeler sonucunda, maksimum yara kontraksiyonu ışınlamadan sonraki 6. ve 12. günlerde gözlenmiştir. Curcumin tedavisi diğer gruplarla karşılaştırıldığında 6, 9 ve 15. günlerde yara kontraksiyonunun önemli bir gelişimi ile sonuçlanmıştır. 2, 4 ve 6 Gy ışınlamadan önceki curcumin tedavisi, ışınlamadan sonraki 6, 9 ve 15. günlerde yaraların kontraksiyonunda radyasyona bağlı gecikmede önemli bir azalış ile sonuçlanmıştır. Deney sonucunda bütün vücut ışınlamanın farklı dozlarına maruz kalmadan önce 100 mg/kg tek doz curcumin ile tedavi edilen farelerin yaralarının iyileşmesinde bir artış olmuş ve kanıt olarak yara küçülmesi ve ortalama yara iyileşme süresinin artması gösterilmiştir.

Grant ve ark. (69) artan dozlarda γ -ışınlarının temel kollajen fibrillerinin yıkımını hızlandığına göstermişlerdir. Curcuminin ışınlama sonrası günlerde kollajen sentezinde radyasyona bağlı azalışı engellediğini rapor etmişlerdir.

Natividad ve ark. (70) yapmış oldukları bir çalışmada ışınlamadan bir saat önce curcuminin $5 \mu\text{g/ml}^{-1}$ ve $500 \mu\text{g/ml}^{-1}$ farklı konsantrasyonlarını, insan periferik kan örnekleri alınan lityum heparinli tüplere ilave etmişler ve 2 Gy radyasyon ile ışınlamışlar. Işınlamadan sonra yapılan insan lenfositlerinin analizinden sitogenetik sonuçlar elde etmişlerdir. Curcumin ilavesi yapılan periferik kan örneklerinde disentrik kromozom frekansı yalnız radyasyon alan kan örnekleriyle karşılaştırıldığında önemli derecede düşük bulunmuştur. $5 \mu\text{g/ml}^{-1}$ 'de radyoprotektif etki % 52.03 ile maksimum seviyeye ulaşmış olduğu ancak $500 \mu\text{g/ml}^{-1}$ 'de metafaz

100 skorlaması yapılamadığı buna sebep olarakta curcuminin bu konsantrasyonda sitotoksik etki oluşturabileceğini öne sürmüşlerdir.

Laboratuvar hayvanlarında kadmiyum aracılığı ile testiküler hasar, iyonize radyasyona bağlı ovaryum toksisitesi, iskemi reperfüzyon yoluyla oluşan testiküler hasarlarda curcuminin koruyucu etkisi çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (71).

Kanter ve ark. (71) yapmış oldukları çalışmada curcuminin antioksidan özelliklerini, diyabet nedeniyle oluşan oksidatif testis hasarını azaltma yeteneği araştırmışlardır. Diyabetik model oluşturularak yapılmış olan bu çalışmada curcumin tedavili gruptaki sıçanlara streptozotocin enjeksiyonundan 3 gün önce başlayarak 8 hafta süresince her gün bir kez 100 mg/kg curcumin oral olarak vermişler. Deney sonucunda curcumin tedavili grup diyabetik grupla karşılaştırıldığında, lipid peroksidasyon seviyesinin anlamlı derecede azaldığı ve testis dokularında antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin arttığını ortaya koymuşlardır. Diyabetik gruplarla karşılaştırıldığında curcumin tedavili gruplarda spermatogenetik seri hücrelerin sayısının arttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada curcumin oksidatif stresi downregüle etmiş ve STZ ile oluşturulan diyabetik sıçanlarda apoptotik hücre ölümü ve testiküler hasarı iyileştirmiştir. Vücut ağırlıkları ve testis ortalama ağırlıklarının istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada total vücut ağırlıklarını deneyin başlangıcında sonuna kadar takip ettik. Sonuç olarak biz curcuminin total vücut ağırlığı üzerine olan etkisinin anlamlı bir fark yaratmadığını gözlemledik. Aynı şekilde ovaryum ağırlıkları açısından da anlamlı bir fark yoktu. Gerçekte ovaryum dokusunun çok küçük olması ve ağırlığının düşük olması sebebiyle curcuminin anlamlı bir fark yaratmasını beklemiyorduk.

Kawloru ve ark. (72) diyabet aracılığı ile oluşan oksidatif stres üzerine curcuminin etkisini araştırmışlardır. Curcuminin diyabetik hastalarda retinopatinin gelişimini engelleyen potansiyel faydalara sahip olabileceğini desteklemişlerdir.

Curcumin, kırık zincir oluşumuna neden olan serbest radikallerin engellenmesi ile DNA ve membran lipidlerin peroksidasyonunun engellemesi ile de hücre membranını korur. Curcuminin hücreleri, DNA hasarından koruma yeteneği hidrofobik olma özelliği ile açıklanmıştır (3,4). Curcumin, iki fenolik hidroksil grup ve bir β -diketon yapısı içerir. Vitamin E gibi çözülebilir bir lipid fenoldür ve lipid membranlara afinitesi yüksek olduğu için çift katmanlı lipid membranlarda yerleşmiştir (3,14). Antioksidan aktivitesi temel olarak serbest radikalleri süpürme

yeteneğinden kaynaklanmaktadır (14). Fenoksil radikallerin oluşumuyla sonuçlanan lipit peroksil radikal, kırılan en zayıf bağa fenolik OH tarafında proton kaybını takiben elektron transferi ile oluşturulur. Curcumin, sitosol içine plazma membranından kolaylıkla geçmekte ve doğrudan lipit peroksil radikalleri ile reaksiyona giren zincir sonlandırıcı antioksidan olarak davranarak hidroksil radikal, süperoksit anyon gibi serbest radikalleri süpürebilmektedir (73).

Thresiamma ve ark. (74) sıçanlarda oral verilen curcuminin (200 µmol/kg) tüm vücut ışınlanmasının meydana getirdiği akciğer fibrozisinde kollajen hidroksiprolinini serum ve karaciğer dokusunda ışınlama ile artan lipit peroksidasyon ürünlerini önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir.

Reddy ve ark. (75) yapmış oldukları çalışmada curcuminin antioksidan enzim aktivitesinin artması ile sıçan karaciğer dokusunda lipit peroksidasyonu engellediğini rapor etmişlerdir.

Reddy ve ark. (76) erkek sıçanlarla yapmış oldukları deneysel bir çalışmada enjeksiyondan 10 gün önce başlayarak oral yoldan 30 mg/kg curcumin takviyesi yapmışlar ve curcumin takviyesinin 10. gününde intraperitoneal yolla Fe^{+2} /tuz enjeksiyonu yapmışlar. Deney sonucunda demir tuzlarının hepatic lipit peroksidasyonu arttırdığını gözlemlemişler. Curcumin takviyesi yapılan sıçanlarda MDA seviyesi önemli derecede düşük bulmuşlardır. Sıçanlara oral yolla curcumin takviyesi sonucunda karaciğer lipit peroksidasyon yüzdesi, Fe^{+2} enjekte edilen sıçanlara göre % 24 ve tuz enjekte edilen sıçanlara göre % 27 oranında düşük bulunmuştur. Curcumin takviyesi yapılan grupta karaciğer tamir enzimleri olan Alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve laktat dehidrogenaz (LDH) seviyeleri sırasıyla % 27, 32 ve 28 olarak ölçülmüştür. Fe^{+2} enjekte edilen sıçanlarda ise bu enzimlerin aktivitesi 3 kat daha fazla ölçülmüştür. Sonuç olarak, curcumin takviyesinin yükselen serum enzimlerinin ve karaciğerde artan lipit peroksidasyonu düşürebileceği fark edilmiştir.

Reddy ve ark. (77). yapmış oldukları farklı bir çalışmada curcuminin H_2O_2 ile Fe^{+2} 'nin oksidasyonunu engellediğini ve ayrıca O_2^- ve OH^- radikallerini süpürdüğünü rapor etmişlerdir.

Nishigaki ve ark. (78) , üç gün içinde bir kez curcumin takviyesi ile CCl_4 'ye bağlı lipit peroksidasyon seviyesinin düştüğünü ve ayrıca karaciğerde meydana gelen histopatolojik değişiklikleri engellediğini belirtmişlerdir. Beş gün içinde bir kez

curcumin takviyesi ile ışınlamanın neden olduğu serum ve karaciğerdeki yükselen lipit peroksidasyon seviyesinin süprese edildiğini kaydetmişlerdir.

Curcumin ayrıca güçlü antioksidan aktiviteye sahip olup in vivo ve in vitro radyasyona karşı koruma sağladığı bildirilmiştir (55).

Oral yolla kullanılan curcuminin diyabetik bozukluk iyileşmesinde ve normal yara tamirinde etkili olduğu rapor edilmiştir (55).

Okunieff ve ark. (79), radyasyon uygulayarak oluşturdukları akut ve kronik kütanöz toksisitede, ışınlamadan 5 gün önce ve sonra 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarında verilen curcuminin koruyucu etkileri çarpıcı bir şekilde görülmüş olup, radyoterapi uygulanan meme kanseri, baş-boyun kanserleri ve sarkomlarda curcumin uygulamasının tedaviye yararlı bir katkı sağlayabileceği rapor edilmiştir.

Kanser hastaları üzerinde curcuminin etkisi ile ilgili yapılan pilot çalışmalarda, günlük 3,6 g doz uygulamalarının güvenli olduğu ve gastrointestinal dokularda oksidatif DNA katılım ürünlerinin seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir (34).

Phan ve ark. (80) insan keratinosit ve fibroblastlarında oksidatif hasara bağlı hidrojen peroksida karşı curcuminin aktif inhibitör özelliği olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızın bir diğer kısmında yakın zamanda radyasyon hasarına karşı bir tamir mekanizması olarak işlev gören PARP-1 enziminin etkisini araştırmak üzerine kurgulamıştık. Yapılan önceki çalışmalarda PARP'ın; beyin, kalp, böbrek, testis ve ovaryumu kapsayan çeşitli doku tiplerinin çekirdeklerinde ifade edildiği tespit edilmiştir (13,81).

Yakın zamana kadar yapılan çalışmalarda, PARP-1'in fonksiyonel olarak hücre bölünmesi, çoğalması, farklılaşması ve hücre ölümü gibi birçok olayda aktif olarak rol aldığı rapor edilmiştir (82).

PARP-1 ifadesi, sağlıklı insan dokularında oldukça düşüktür. Yapılan çalışmalarda pek çok kanser tipinde PARP-1'in ifade derecesi, normal dokularla karşılaştırıldığında en çarpıcı farklardan birkaçı ovaryum ve endometriyal kanserli dokularda ortaya çıkmıştır (83).

Ossovskaya ve ark. (83) yapmış oldukları bir çalışmada göğüs, akciğer, ovaryum ve deri kanseri gibi hastalıklara sahip birçok hastadan izole edilen malignan dokularda PARP-1 ifadesinin kuvvetli derecede artmış olduğunu rapor etmişlerdir.

PARilasyon mekanizması, iyonize radyasyon, alkilleyici ajanlar ve oksidanlar tarafından uyarılan DNA hasarına en hızlı hücresele yanıtı vermektedir. Normal DNA zincir kırıklarının varlığında PARilasyon çok nadir gerçekleşen bir olaydır, ancak DNA hasarı 100 kat artarsa PARP'nin temel aktivitesi de dikkat çekici bir şekilde artmaktadır. Bu koşullar altında PARP'nin yaklaşık % 90'ı PARP-1 tarafından sentezlenmektedir (39).

PARP-1, ADP-riboz polimerlerinin sentezini katalizleyen, DNA zincir kırıkları ile aktive olan ve değişim süresince yüksek derecede korunan 116 kDa'lık nükleer bir enzimdir (84,85).

Oksidatif stres çeşitli hastalıklara neden olan araçları içeren ROT'un aşırı üretimidir. ROT ve hidroksil radikaller, PARP-1'in hızlı aktivasyonunu tetikleyen DNA hasarına neden olmaktadır. Diğer genotoksik ajanların arasında: O_2^- , NO^- ve onların reaksiyonları sonucunda üretilen peroksinitrit bulunmaktadır. Tiyollerle reaksiyona giren peroksinitrit, oksidasyon aracılığı ile proteinleri inaktive etmektedir ve lipit peroksidasyonu tetiklemektedir. Bu mekanizma, PARP'nin hızlı aktivasyonunu tetikleyen DNA kırıklarına sebep olmaktadır. DNA hasar bölgesine bağlanma, PARP-1'in ikinci çinko parmakçıkları üzerinden gerçekleşmektedir (86).

PARP-1'in DNA bağlanma domaini ve bir BRCT modeli bulunduran otomodifikasyon domaini XRCC1 (X-ray cross complementing enzim)'in DNA tamirinde önemli bir kontrol noktası olan BRCT-1 motifi ile bağlantı halindedir ve BER onarımında önemli rollere sahiptir.

XRCC1'in PARP-1 ile olan etkileşimi PARP-1'in DNA kırıklarına bağlanmasını sağlamakta, PARilasyon aktivitesini düzenlemekte ve diğer BER mekanizması enzimlerinin XRCC1'e bağlanarak DNA tamirini tamamlamasını sağlamaktadır (88).

Reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu tek zincir DNA kırıklarının ve baz hasarlarının tamirinde en çok kullanılan mekanizma BER mekanizmasıdır.

Eğer DNA'da hasarlı bir baz var ise DNA glikozilaz enzimi tarafından tanıma gerçekleşir. DNA glikozilaz enzimi hasarlı bölgeyi tanımak için DNA'nın küçük oyuğuna yerleşerek hasar gören baz ile nükleotidin şeker komponenti arasındaki N- β glikozidik bağın kırılmasını sağlayarak bazın polinükleotitten ayrılmasını gerçekleştirir. İnsanlarda birbirinden farklı yaklaşık 10 tane DNA glikozilaz enzimi tanımlanmıştır.

DNA glikozilazın hasarlı bölgeyi çıkarmasından sonra oluşan bazsız bölge apürinik/apirimidinik bölge (AP bölgesi) olarak adlandırılır. AP bölgesi AP endonükleaz (APE) tarafından tanınır. Bunun için XRCC1 enzimi hasarlı bölgede DNA glikozilaz enziminin APE ile yerdeğiştirmesine yardım ederek hasarlı bazın çıkarılmasını hızlandırır. Bundan sonra fosfodiesteraz enzimleri AP bölgesindeki fosfodiester bağının kırılmasını sağlamaktadır. Böylelikle AP bölgesinin 3' ucunda hidroksil grubu ve 5' ucunda deoksiriboz fosfat bulunan bir boşluk oluşur.

AP bölgesindeki fosfodiester bağlarının APE tarafından kırılmasından sonra PARP-1 enzimi kırık DNA uçlarına bağlanarak onları degradasyondan korumaktadır. PARP-1 kendisini PARilasyonla aktifleştirir. Aktive olan PARP-1 daha sonra BER mekanizmasında işlev gören enzimlerin aktivasyonuna yol açar.

PARP-1 tarafından aktive olmuş XRCC1 enzimi APE1 enziminin DNA polimeraz β ile bağlantısını düzenleyerek polimerizasyon ve ligasyon basamağının aktivasyonunu sağlar. Bu aşamadan sonra tamir kısa ve uzun yolak olmak üzere iki alternatif yoldan devam etmektedir.

Memelilerde, kısa yolak boyunca sadece bir hatalı nükleotid, uzun yolakta ise 2-12 nükleotitten oluşan kırıklar kesilip çıkartılmaktadır. AP bölgesinin bağlanması kısa yolakta DNA polimeraz β tarafından gerçekleştirilir. Uzun yolakta ise ilk nükleotidin sentezi DNA polimeraz β , ondan sonra gelen nükleotidleri ise DNA polimeraz δ ve ϵ tarafından gerçekleştirilir. Uzun tamir yolağında polimerizasyon aşamasında PCNA ve RPC adı verilen iki protein daha senteze katılmaktadır.

BER'in en son basamağında DNA ligaz enzimi tarafından fosfodiester bağları oluşturulur. Kısa BER yolağında LIG3 α , uzun BER yolağında ise LIG1 adı verilen DNA ligaz enzimleri iş görmektedir (87,88).

İyonize radyasyon gibi çevresel genotoksik ajanların neden olduğu DNA hasarlarına yanıtlarda genomun bütünlüğünün korunmasında PARP-1 için birçok destekleyici kanıt vardır (85).

Qian ve ark. (13) yapmış oldukları bir çalışmada, fare ovariumunda uyguladıkları immünohistokimyasal yöntemler sonucunda, PARP-1'in primordiyal follikülden olgun folliküle kadar tüm follikül gelişim evrelerinde özellikle oosit çekirdeğinde oldukça kuvvetli bir boyanma gösterdiğini bulmuşlardır. Buna ek olarak primer follikül evresi ve sonrasında çok kuvvetli olmamakla beraber PARP-1'in bazı granüloza hücrelerinde de var olduğunu gözlemlemişlerdir.

Tekcan ve ark. (81) deneysel varikozel modeli oluşturdukları çalışmalarında, spermatogenezin tam olarak gerçekleştiği seminifer túbüllerde, üreme hücrelerinin çekirdeklerinde, PARP-1'in bariz bir ifadesini ortaya çıkarmışlardır. Tam spermatogenezin gözlendiği túbüllerde PARP-1'in spermatogonyum ve primer spermatoisitlerdeki lokalizasyonunu immün boyamanın güçlü seviyeleri ile rapor etmişlerdir.

Atorino ve ark. (89) yapmış oldukları bir çalışmada rat germinal hücrelerinde PARP-1'in H₂O₂ hasarı ve  ışınlaması ile oluşan DNA hasarının tamiri için gerekli olduğunu kaydetmişlerdir.

8 Gy  radyasyona maruz kalan PARP^{-/-} ve PARP^{+/+} fareleri ışınlamadan sonra yapılan kromozomal analizler sonucunda hücre çekirdeklerindeki kromozom kırılım oranının PARP^{-/-} farelerinde PARP^{+/+} farelerine göre 3 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (90).

Biyolojik fonksiyonunu belirlemek için, farelerin hedef genleri ile allellerin her ikisinde inaktivite edilerek yapılan bir çalışmada PARP^{-/-} farelerine  ışınlaması ile uygulanmış ve radyasyona karşı yüksek genomik kararsızlık ve aşırı hassasiyet gösterdikleri ortaya çıkmıştır (90).

İyonize radyasyon maruziyetini takiben PARP^{-/-} farelerinin kemik iliği hücrelerinde bütün S ve G₂ fazlarında PARP enzimi eksikliği neticesinde düzeltilemeyen yoğun DNA hasarı ortaya çıkmıştır (90).

Çalışmamızda, son yılların önemli bir araştırma konusu olan ve hücre ölüm yolaklarıyla doğrudan ilişkisi bulunan PARilasyon mekanizmasının ve radyasyon hasarının ortak noktalarından yola çıkararak, PARP-1'in araştırılması hedeflerimizden birisi olmuştur. Çalışmamızda, iyonize radyasyon modeli başarılı bir şekilde oluşturulmuş ve oksidatif stres artışı ve hücre hasarı histolojik düzeyde açıkça gösterilmiştir. Bu stresin, follikül hücre ve oosit çekirdeklerinde oluşturduğu hasar immünohistokimyasal olarak belirlenmiş ve hasarın derecesi semikantitatif olarak ortaya konmuştur.

6. SONUÇLAR

Radyoterapi esnasında ovaryum dokusunda gözlenen ve infertiliteye neden olan hasarı önlemede, curcuminin etkisini morfolojik, morfometrik ve immünohistokimyasal açıdan incelemek amacı ile planladığımız çalışmada aşağıda sıralanan sonuçları elde ettik;

1. Curcuminin etkisini araştırmak amacıyla deneyin başlangıcından sonuna kadar deney hayvanlarının ağırlıklarını tarttık. Özellikle ışınlama sonrası ağırlıkları dikkate aldığımızda radyasyon ve radyasyon+curcumin grubu arasında anlamlı bir fark gözlemedik.
2. Benzer şekilde sakrifikasyon sonrası ovaryum ağırlıklarını tarttığımızda yine radyasyon ve radyasyon+curcumin grubu arasında anlamlı fark gözlenmedi. Ovaryum dokusunun sıçanlarda küçük olması ve ağırlık değerlerinin çok düşük olmasında bu sonucun bir etkeni olduğunu düşünmekteyiz.
3. Tüm grupların sağlıklı ve atretik follikül sayılarını incelediğimizde curcuminin özellikle radyasyon uygulaması sonrası azalan primordiyal follikül sayısında bir artış yarattığı gözlemlendi. Radyasyon ve radyasyon+curcumin gruplarını atretik follikül sayısı açısından karşılaştırdığımızda curcumin uyguladığımız grupta atretik follikül sayısının bir miktar azaldığını ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığını gördük.
4. Grupları histopatolojik olarak karşılaştırdığımızda özellikle sadece radyasyon uyguladığımız grupta ovaryum dokusundaki hasarın çok belirgin olduğunu, sayısal verilere paralel olarak primordiyal folliküllerin germinal epitel altında nadiren bulunduğunu gözlemledik. Radyasyon+curcumin grubunda ise doku hasarının biraz daha azaldığı gözlemlendi.
5. Ovaryum dokusunda PARP-1 ifadesini değerlendirdiğimizde follikülogenezin her aşamasında PARP-1 ifadesini gözlemledik. Özellikle sadece radyasyon uyguladığımız grupta PARP-1 ifadesinin yoğun oluşu ve radyasyon+curcumin grubunda bu ifadenin azalması dikkat çekiciydi.

Sonuç olarak, çalışmamızda curcuminin ovaryum doku hasarı ve follikülogenez sürecinde kısmen olumlu etkilerini gördük. Ancak yeni planlanacak doz kontrollü deneysel bir modelde, curcuminin optimum terapötik dozunun saptanmasının kliniğe katkı sağlayabileceği düşüncesindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Yaren H, Karayılıanoğlu T. Radyasyon ve insan sağlığı üzerine etkileri. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni 4(4):199-208, 2005.
2. Uzal C, aloğlu M. Kanser etyolojisinde iyonizan radyasyonun yeri. Trakya Üniv Tıp Fak Derg. 19:177-182, 2002.
3. Ogilvy-Stuart A.L, Shalet S.M. Effect of radiation on the human reproductive system. Enviromental Health Perspectives Supplements 101:109-116,1993.
4. Daşdağ S. İyonlaştırıcı radyasyonlar ve kanser. Dicle Tıp Dergisi 237(2):177-185, 2010.
5. Pangas S.A, Matzuk M.M. Genetic models for transforming growth factor beta superfamily signaling in ovarian follicle development. Mol Cell Endocrinol 225:83-91, 2004.
6. Yucebilgin M.S, Terek M.C, Ozsaran A, Akercan F, Zekioglu O, Isik E, Erhan Y. Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: an animal model of premature ovarian failure and infertility. Aust N Z J Obstet Gynaecol 44:6-9, 2004.
7. Meirow D. Ovarian injury and modern options to preserve fertility in female cancer patients treated with high dose radiochemotherapy for hemato-oncological neoplasias and other cancers. Leuk Lymphoma 33:65-76, 1999.
8. Howell S, Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. Endocrinol Metab Clin North Am 27:927-943, 1998.
9. Apperley J.F, Reddy N. Mechanism and management of treatment-related gonadal failure in recipients of high dose chemoradiotherapy. Blood Rev 9:93–116, 1995.
10. Kanter M, Topçu Tarladaçalışır Y, Akpolat M, Mercantepe T. Gamma radyasyona bağlı oluşan jejunum mukoza hasarına karşı curcumin ve amifostinin koruyucu etkilerinin incelenmesi. Tıp Araştırmaları Dergisi 6(3):128–135, 2008.
11. Lilyestrom W, van der Woerd M.J, Clarck N, Luger K. Structural and biophysical studies of human PARP-1 in Complex with Damaged DNA J Mol Biol 395:983-994, 2010.

12. Stilmann M, Michael H, Arslan S, Zimmer A, Schreiber V, Scheidereit C. A nuclear Poly(ADP-Ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced IκB Kinase activation. *Molecular Cell* 36:365-378, 2009.
13. Qian H, Xu J, Lalioti M.D, Gulle K, Sakkas D. Oocyte numbers in the mouse increase after treatment with 5-Aminoisoquinolinone: A potent inhibitor of poly(ADP-ribosyl)ation. *Biology of Reproduction* 82:1000-1007, 2010.
14. Özalpan A. Temel Radyobioloji, Haliç Üniversitesi Yayınları, No:3001, 2001.
15. Uslu İ, Güven N, Gözbebek F. Radyasyon ve Bilmek İstediklerimiz, TAEK, 3-5, 2004.
16. Algüneş, Ç. Radyasyon Biyofiziği. 1. Basım, Trakya Üniversitesi Yayınları Edirne, 51:59-62, 2002.
17. Steel GG. The Significance of Radiobiology for Radiotherapy in; Steel GG. Basic Clinical Radiobiology. Oxford University Pres, New York, 1-7, 1997.
18. Togay Y.E. Radyasyon ve Biz, TAEK, 7-10, 2004.
19. Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, 2005, Erişim Adresi: www.nukleer.gov.tr. Erişim Tarihi: 2013.
20. Yiğit Ş. Radyasyonun Biyolojik Etkileri, Radyasyon Sağlığı ve Güvenliği Dairesi, TAEK, 14-15, 2004.
21. Dalcı DÖ. Radyasyonun etkisiyle meydana gelen kromozom aberasyonlarının biyolojik dozimetri olarak değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi, 1993.
22. Pesty A, Doussau M, Lahaye JB, Lefevre B. Whole-body or isolated ovary ⁶⁰Co irradiation: Effects on in vivo and in vitro folliculogenesis and oocyte maturation. *Reproductive Toxicology* 29:93-98, 2010.
23. Kaya A. İyonize radyasyonun biyolojik etkileri. *Dicle Tıp Dergisi* 29:3, 2002.
24. Jarrel J, YoungLai E.V. Memahon A. Effects of ionizing radiation and pretreatment with luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on developing rat ovarian follicles. *Cancer Res* 47:5005-5008, 1987.
25. Aktas C, Kanter M, Kocak Z. Antiapoptotic and proliferative activity of curcumin on ovarian follicles in mice exposed to whole body ionizing radiation. *Toxicology and Industrial Health* 1-12, 2011.
26. Gardner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*. 3rd edition. pp 334-43, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 334-59, 2000.

27. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology a Text and Atlas. 4th edition. pp 730-38, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 727-742, 2003.
28. Erdoğan D, Hatipoğlu MT, Görgün M, İlgaz C. Özel Histoloji. Hatipoğlu. 175-181, 2007.
29. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji (Çev. Ed: Solakoğlu S, Aytekin Y) s. 449-458, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 2006.
30. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi (Çev. Ed: Demir R) s 565-576, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006.
31. Murathanoglu O, Histoloji. İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi. 272-273, 1996.
32. Menon V.P, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. 105-125.
33. Huang MT, Lou YR, Me W, Newmark HL, Reuhl KR, Conney H. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal and colon carcinogenesis in mice. Cancer Res 54:5841-7, 1994.
34. Akpolat M, Topçu Tarladaçalışır Y, Uz YH, Sapmaz MM, Kızılay G. Kanser Tedavisinde Curcuminin Yeri. Yeni Tıp Dergisi, 27:142-147, 2010.
35. Amani AR, Somchit MN, Konting MMB, Kok LY. Vitamin E and curcumin intervention on lipid-peroxidation and antioxidant defense system. Journal of American Science 6:3, 2010.
36. Oracle, 2010, Erişim Adresi: www.healthoracle.org. Erişim Tarihi: 2013.
37. Sekhon L.H, Gupta S., Kim Y., Agarwal A. Female infertility and antioxidants. Current Women's Health Reviews 6:84-95, 2010.
38. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. Nat Rev Mol Cell Biol 7:517-28, 2006.
39. Bürkle A. Poly (ADP ribose): The most elaborate metabolite of NAD⁺. FEBS Journal 272:4576–4589, 2005.
40. Smith S, Giriat I, Schmitt A, de Lange T. Tankyrase, a poly(ADP ribose) polymerase at human telomeres. Science 282:1484-7, 1998.
41. Dantzer F, Schreiber V, Niedergang C. Involvement of Poly (ADPRibose) Polymerase in Base Excision Repair. Biochimie. 81:69- 75, 1999.
42. Diefenbach J, Bürkle A. Introduction to Poly (ADP-Ribose) Metabolism. CMLS. Cell Mol Life Sci. 62:721-730, 2005.

43. Wang X.G, Wang Z, Tong WM, Shen Y. PARP-1 Val762Ala Polymorphism reduces enzymatic activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. March 351(1):122-126, 2007.
44. Sousa FG, Matuo R, Soares DG, Escargueil AE, Henriques JAP, Larsen .K, Saffi J. PARPs and the DNA damage response. *Carcinogenesis* 33, 1433-1440, 2012.
45. Masutani M, Nakagama H, Sugimura TS. Poly(ADP-ribosyl)ation in relation to cancer and autoimmune disease. *CMLS. Cell Mol Life Sci*. 62:769-783, 2005.
46. 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* 19:71-77, 2004.
47. Lee CJ, Park HH, Do BR, Yoon YD, Kim JK. Natural and radiation induced degeneration of primordial and primary follicles in Mouse ovary. *Animal reproduction Science* 59:109-117, 2000.
48. Srinivasan M, Ram Sudheer, Raveendran PK, Raghu KP, Sudhakaran PR, Menon VP. Modulatory effects of curcumin on γ - radiation-induced cellular damage in primary culture of isolated rat hepatocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 24:98-105, 2007.
49. Wallace WB, Kelsey TW, Sklar C, Robison LL, Stovall M, Whitton J, Green D, Chemaitilly W. The radiosensitivity of the human oocyte: a revised estimate using data from the CCSS on women who had developed premature ovarian failure following a known dose of radiation to the ovary as part of their treatment of cancer. 2006.
50. Wallace WHB, Thomson AB, Kelsey TW. The radiosensitivity of the human oocyte. *Human Reproduction* 18(1):117-121, 2003.
51. Metindir J, Bozkurt C. Kanser tedavilerinin over fonksiyonlarına etkisi ve fertilitede koruyucu yaklaşımlar. *J Turkish German Gynecol Assoc* 6(1):23-29, 2005.
52. Kelle İ. Radyoprotektif Etkili Ajanlar. *Dicle Tıp Dergisi* 35(1):69-76, 2008.
53. Prasad KN. Rationale for using multiple antioxidants in protecting human against low doses of ionizing radiation. *Br J Radiol* 78,485-92, 2005.
54. Thibaud E, Rodriquez MK, Trivin C. Ovarian function after bone marrow transplantation during childhood. *Bone Marrow Transplant* 22:989-994, 1998.

55. Jagetia GC, Rajanikant GK. Role of curcumin, a Naturally occurring phenolic compound of Turmeric in Accelerating the repair of excision wound, in mice whole-body exposed to various doses of γ - radiation. *Journal of Surgical Research* 120:127-138, 2004.
56. Take G, Erdogan D, Helvacioğlu F, Göktas G, Ozbey G, Uluoglu C, Yücel B, Guney Y, Hicsonmez A, Ozkan S. Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42:621-628, 2009.
57. Wilson RL. Free radical repair mechanisms and the interaction of glutathione and vitamin C and E. In: O. F. Nygaard and M. G. Simic (Eds.). *Radioprotectors and Anticarcinogens*. New York; Academic Pres. 1-23, 1983.
58. Agarwal A, Allamaneni S.S.R. Oxidants and antioxidants in human fertility. *Mid East Fert Soc J* 9(3):187-197, 2004.
59. Choudhary D. Modulation of radioresponse of glyoxalase system by curcumin. *J of Ethnoph* 46:1-7, 1999.
60. Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod.* 65(5):1245- 52, 2000.
61. Kim JK, Lee CJ. Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in γ -irradiated mouse. *Mutat Res* 449:33-39, 2000.
62. Lee YK, Chang HH, KimWR, Kim JK, Yoon YD. Effects of gamma radiation on ovarian follicles. *Arh hig rada toksikol* 49:147-153, 1998.
63. Mole RH, Papworth DG. The sensitivity of rat oocytes to X-rays. *Int Radiat Biol* 6:609-15, 1966.
64. Nishida T. Study on morphological changes of ovaries in mice exposed to ^{60}Co gamma ray irradiation. *The Kurume Medical Journal* 27:197-207, 1980.
65. Inano H, Onoda M, Inafuku N, Kubota M, Kamada Y, Osawa T, Kobayashi H, Wakabayashi K. Chemoprevention by curcumin during the promotion stage of tumorigenesis of mammary gland in rats irradiated with gamma rays. *Carcinogenesis* 20(6):1011-1018, 1999.
66. Akpolat M, Tarladaçalışır YT, Kanter M. İyonizan Radyasyonun Neden Olduğu İnce Bağırsak Hasarına Karşı Curcumin ve C Vitamininin Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 6(2):77-85, 2008.

67. Antunes LMG, Araujo MCP, Dia PBL, Takahashi C. Effect of H₂O₂, Fe⁺² and Fe⁺³ on curcumin-induced chromosomal aberrations in CHO cells. *Genet. Mol. Biol.* 28:161-164, 2005.
68. Thresiamma KC, George J, Kuttan R. Protective effect of curcumin ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. *J Exp Clin Cancer Res* 17:431-4, 1998.
69. Grant RA, Cox RW, Kent CM. The effects of gamma irradiation on the structure and reactivity of native and cross linked collagen fibrils. *J Anat* 115:29, 1973.
70. Natividad S, Montoro A, Montoro A, Almonacid M, Villaescusa J I, Cervera J, Such E, Silla M A, Soriano J M. Assessment in vitro of radioprotective efficacy of curcumin and resveratrol. *Radiation Measurements* 46:962-966, 2011.
71. Kanter M, Aktas C, and Erboga M. Curcumin attenuates testicular damage, apoptotic germ cell death, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res* 56:1-8, 2012.
72. Kawluru RA, Kanwar M. Effects of curcumin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes. *Nutr Metab* 4:8, 2007.
73. Khopde SM, Priyadarsini KI, Guha SN, Satav JG, Venkatesan P, Rao MNA. Inhibition of radiation-induced lipid peroxidation by tetrahydrocurcumin: Possible mechanisms by pulse radiolysis. *Biosci Biotechnol Biochem* 64(3):503-509, 2000.
74. Thresiamma KC, George J, Kuttan R. Protective effect of curcumin ellagic acid and bixin on radiation induced toxicity. *J Exp Biol* 34:845-7, 1996.
75. Reddy P, Lokesh BR. Alterations in lipid peroxides in rat liver by dietary n-3 fatty acids: modulation of antioxidant enzymes by curcumin, eugenol and vitamin E. *J Nutr Biochem* 5:181-8, 1994.
76. Reddy P, Lokesh BR. Effects of curcumin and eugenol on iron-induced hepatic toxicity in rats. *Toxicology* 107:39-45, 1996.
77. Reddy P, Lokesh BR. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol Cell Biochem* 137:1-8, 1994.
78. Nishigaki I, Kuttan R, Oku H, Ashoori F, Abe H, Yagi K. Suppressive effect of curcumin on lipid peroxidation induced in rats by CCl₄ or ⁶⁰Co irradiation *J Clin Biochem Nutr* 13:23-30, 1992.

79. Okunieff P, Xu J, Hu D, Liu W, Zhang L, Marrow G. Curcumin protects against radiation-induced acute and chronic cutaneous toxicity in mice and decreases mRNA expression of inflammatory and fibrogenic cytokines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65:890-8, 2008.
80. Phan TT, See P, Lee S.T, Chan SY. Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro. Its implication for wound healing. *J Trauma* 51:927, 2001.
81. Tekcan M, Koksall T.K, Tasatargil A, Kutlu O, Gungor E, Celik-Ozenci C. Potential role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of experimental left varicocele. *Journal of Andrology*, 2011.
82. Nossa CW, Blanke SR. Helicobacter pylori activation of PARP-1: Usurping a versatile regulator of host cellular death. *Gut Microbes* 1(6), 373-378, 2010.
83. Ossovskaya V, Chou KI, Kaldjian EP, Alvares C, Sherman BM. Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types. *Genes & Cancer*. 1:812-821, 2010.
84. Erdelyi K. Role of PARP-1 and PARG in the regulation of cell death and in the expression of inflammatory mediators. University of Debrecen, Debrecen, 2009.
85. Di Meglio S, Denegri M, Vallefucio S, Tramontano F, Scovassi AI, Quesada P. Poly(ADPR) polymerase-1 and poly(ADPR) glycohydrolase level and distribution in differentiating rat germinal cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 248:85-91, 2003.
86. Bakondi E. Alterations in PARP metabolism and calcium homeostasis in oxidatively stressed HaCaT and Mouse macrophage cell lines. University of Debrecen, Debrecen, 2003.
87. Kramer MA. PARP-1 and its Dna-Binding Characteristics. Colorado State University, Colorado, 2011.
88. Tezcan G. PARP-1 ve XRCC1 polimorfizmlerinin astım'da DNA onarım mekanizması ile olan ilişkisinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi İstanbul, 2008.
89. Atorino L, Di Meglio S, Farina B, Jones R, Quesada P. Parp requirement of rat germinal cells in the recovery from DNA damage induced by gamma irradiation and H₂O₂ treatment. *Eur J Cell Biol* 80:222-229, 2001.

90. De Murcia JM, Neidergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, Lemeur M, Waltzinger C, Chambon PP, De Murcia G. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci* 94:7303-7307, 1997.

8. EKLER

Ek.1. Türkçe Etik Kurul Onayı



20
T.C.

**Zonguldak Karaelmas Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu**



TOPLANTI TARİHİ : 28/03/2012
TOPLANTI NO : 2012/03



2- ZKÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Kanat GÜLLE'nin 2012-16-28/03 Protokol no'lu "İyonize Radyasyona Maruz Kalan Sıçan Ovaryumunda PARP-1(Poli ADP-riboz polimeraz-1) Ekspresyonu ve Folikülogenez Üzerine Curcuminin Koruyucu Etkisi" konulu başvurusunun Etik Kurul ilkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

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


Ek.2. İngilizce Etik Kurul Onayı



29
T.C.
**Zonguldak Karaelmas University
Animal Experiments Local Ethical
Committee**

Date of Meeting : 28 March 2012
Meeting No : 2012/03

2- Research Application Registered by 2012-16-28/03 and titled "Protective effect of curcumin on folliculogenesis, and PARP-1(Poly ADP-ribose polymerase-1) expression exposed ionising radiation in rat ovary" has been approved by the Animal Experiments Local Ethical Committee



Prof. Dr. Z. Nur BANOGLU
Animal Experiments Local Ethical Committee Director

Z.K.Ü. HADYEK , 67600 Kozlu/ZONGULDAK, Tel:0 372 261 3135-3136-3139 Fax: 0 372 261 02 64

9. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi aynı ilde tamamladım. 2004 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne başladım. Lisans eğitimimin ilk yılında, Yabancı Diller Zorunlu Hazırlık Programında İngilizce eğitim aldım ve 2009 yılında Biyoloji bölümünden mezun oldum. 2011 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Eğitim süresi içerisinde Çek Cumhuriyeti, Masaryk University, CEITEC araştırma laboratuvarlarında kök hücre ve moleküler teknikler konusunda 3 aylık eğitim aldım.