



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ERİŞKİN SIÇAN OVARYUMUNDA
METOTREKSAT HASARINA KARŞI
KARAYEMİŞİN ETKİLERİ**

Canan GÜNEY

Yüksek Lisans Tezi

Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU

TRABZON-2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ERİŞKİN SIÇAN OVARYUMUNDA
METOTREKSAT HASARINA KARŞI
KARAYEMİŞİN ETKİLERİ**

Canan GÜNEY

Yüksek Lisans Tezi

Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU

TRABZON-2019

ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Canan GÜNEY'in hazırladığı “Erişkin Sıçan Ovaryumunda Metotreksat Hasarına Karşı Karayemişin Etkileri” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca, kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oybirliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU _____

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ _____

Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU _____

Doç. Dr. Levent TÜMKAYA _____

Tarih:/.../201.

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../201. tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ersan KALAY

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

09/01/2019

Canan GÜNEY

.....

İTHAF

Tüm yaşamım boyunca varlıklarıyla bana güç veren, sevgilerini, anlayışlarını ve desteklerini her koşulda gösteren babacığım Mehmet Can GÜNEY, anneciğim Arzum GÜNEY ve abiciğim Hakan GÜNEY iyi ki varsınız. Siz bana verilen en güzel armağansınız. Bu yüksek lisans tez çalışmamı onlara ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

İlk yüksek lisans öğrencisi olarak kendisiyle çalışabilme avantajına sahip olduğum, bu çalışmada bana yön veren her konuda benden bilgisini deneyimini ve yardımlarını esirgemeyen, birlikte çalışmaktan onur duyduğum, başta sevgili tez danışman hocam Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU'na,

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda almış olduğum yüksek lisans eğitimi boyunca, eğitimimde katkıları bulunan değerli hocalarım, Prof. Dr. Engin YENİLMEZ'e, Prof. Dr. Esin YULUĞ'a, Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU'na,

KTÜ Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sevgi Kolaylı'ya, KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, KTÜ Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Selim DEMİR'e ve geride bize bıraktığı akademik ışıyla her zaman aydınlatacak olan hocamız Prof. Dr. Ersan ODACI'ya,

Tez sürecim boyunca sıkıntıya düştüğüm ve stresli olduğum her anda bana güç veren, beni sakinleştiren ve yardımlarını hiç esirgemeyen Gamze BİLGİN, Ali KULABER ve sevgili Gökberk İSKENDEROĞLU'na, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne ve adını sayamadığım Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma, ayrıca TYL-2017-6993 nolu projemize destek veren Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca beni koşulsuz seven ve destekleyen, yaptıkları fedakarlıklar ve aşıladıkları değerler ile bugünlere gelmemi sağlayan ve bu araştırmada bana destek olan hayatımın her aşamasında yılmadan yol almamı sağlayan babam Mehmet Can GÜNEY'e, umutlarım tükendiğinde bile bana güvenen annem Arzum GÜNEY'e, her konuda sonsuz desteğini hiç esirgemeyen abim Hakan GÜNEY'e, güzel aileme ve kendimden bildiklerime beni ben yaptıkları için ömür boyu minnettar olacağım.

Yük. Lis. Öğr. Canan GÜNEY

İÇİNDEKİLER**Sayfa**

ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Ovaryum	5
4.1.1. Ovaryum Anatomisi ve Histolojisi	5
4.1.2. Ovaryum Embriyolojisi	6
4.1.3. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi	7
4.1.3.1. Primordiyal Folikül	9
4.1.3.2. Primer Folikül	9
4.1.3.3. Sekonder Folikül	10
4.1.3.4. Olgun Folikül (Graaf Folikülü)	11
4.1.3.5. Atretik Folikül	12
4.1.4. Ovaryum Rezervi ve Anti Müllerian Hormon	12
4.2. Metotreksat	14
4.2.1. Kimyasal Yapısı	14
4.2.2. Etki Mekanizması	15
4.2.3. Yan Etkileri	15
4.3. Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	16
4.4. Karayemiş	18
4.4.1. Karayemişin Genel Özellikleri	19

5. GEREÇ ve YÖNTEM	21
5.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Destek	21
5.2. Deney Hayvanları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı	21
5.3. Karayemiş Meyve Ekstraktının Hazırlanması	22
5.3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi	23
5.3.2. Toplam Flavonoid Tayini	24
5.3.3. Demir (III) İndirgeme Yöntemi (FRAP)	24
5.3.4. DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi	25
5.3.5. Fenolik Profilin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)'de Belirlenmesi	25
5.3.5.1. Numunenin HPLC-UV Analizine Hazırlanması	25
5.3.5.2. Standartlar ve Kalibrasyon	25
5.3.5.3. HPLC-UV Analizi	26
5.4. Histolojik İşlemler	26
5.4.1. Ovaryumların Çıkarılması	26
5.4.2. Doku Takip Protokolü	27
5.4.3. Hematoksilen Eozin Boyaması	27
5.4.4. Over Foliküllerinin Sayımı	28
5.4.5. Masson Trikrom Boyaması	28
5.4.6. İmmünohistokimyasal Boyama	28
5.5. Biyokimyasal Analiz	29
5.5.1. Doku Örneklerinin Hazırlanışı	30
5.5.2. Doku Örneklerindeki Protein Miktarlarının Belirlenmesi	30
5.5.3. MDA Düzeyinin Belirlenmesi	30
5.5.4. AMH Seviyelerinin Belirlenmesi	31
5.5.6. SOD Seviyelerinin Belirlenmesi	31
5.5.7. 8-OHdG Seviyelerinin Belirlenmesi	32
5.5.8. CAT Seviyelerinin Belirlenmesi	32
5.5.9 GSH Seviyelerinin Belirlenmesi	33
5.5.10. TOS Seviyelerinin Belirlenmesi	33
5.5.11. TAS Seviyelerinin Belirlenmesi	33
5.5.12. Oksidatif Stres İndekslerinin Hesaplanması	33

5.6. İstatistiksel Analiz	34
6. BULGULAR	35
6.1. Karayemişin Antioksidan Kapasitesine Ait Bulgular	35
6.2. Morfolojik Bulgular	35
6.2.1. Folikül Sayısı	35
6.2.2. Histopatolojik Değerlendirme	38
6.2.3. Apoptoz	43
6.3. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular	46
6.3.1. Doku Biyokimyası	46
7. TARTIŞMA	47
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	52
9. KAYNAKLAR	54
10. ETİK KURUL FORMU	64
11. ÖZGEÇMİŞ	65

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	Toplam fenolik madde miktarı pipetleme işlemi	23
Tablo 2.	Toplam flavonoid miktarı pipetleme işlemi	24
Tablo 3.	İmmünohistokimyasal işlemler	29
Tablo 4.	Toplam polifenol (TP), toplam flavonoid (TF), toplam tanen (TT), FRAP ve DPPH testleri sonuçları	35
Tablo 5.	Folikül sayılarının gruplara göre dağılımı	37
Tablo 6.	Ovaryum dokularına ait biyokimyasal parametreler	46



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	Ovaryum yapısı	5
Şekil 2.	Ovaryum anatomisi	6
Şekil 3.	Folikül gelişimi	8
Şekil 4.	Primordiyal folikül	9
Şekil 5.	Erken primer ve geç primer folikül	10
Şekil 6.	Sekonder folikül	11
Şekil 7.	Graaf folikülü	12
Şekil 8.	Ovaryumda AMH etkisinin modeli	13
Şekil 9.	MTX'in moleküler yapısı	15
Şekil 10.	Ferrik-tripiridiltriiazin kompleksi ile antioksidan arasındaki reaksiyon	25
Şekil 11.	Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği	30
Şekil 12.	AMH ölçümünde kullanılan standart grafiği	31
Şekil 13.	Doku SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği	31
Şekil 14.	Doku 8-OHdG ölçümünde kullanılan standart grafiği	32
Şekil 15.	Doku CAT ölçümünde kullanılan standart grafiği	32
Şekil 16.	Doku GSH ölçümünde kullanılan standart grafiği	33
Şekil 17.	Gruplara ait fibröz doku ve kollajen skorlaması	38
Şekil 18.	Gruplara ait vazokonjesyon skorlaması	38
Şekil 19.	Aİ'in gruplara göre ortalaması±ortalamların standart deviasyon değerleri ve karşılaştırılması	43

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Olgunlaşmakta olan karayemiş meyvesi	19
Resim 2. Sıçanların çalışma süresince barındırıldığı standart tip III kafesler	22
Resim 3. Karayemiş ekstrakt hazırlama ve gavaj uygulaması	23
Resim 4. Sıçanlarda ovaryumların çıkarılma işleminin basamakları	27
Resim 5. Sıçan ovaryumuna ait bir kesitte (A) ovaryumun medullası (yeşil ok) ve korteksi (yıldızlar) görülmektedir (H&E x 40). Diğer bir ovaryum kesitte (B) ise primordiyal folikül (ok başı) ve ovaryum yüzeyini örten germinal epitel (mavi ok) izlenmekte (H&E x 400)	36
Resim 6. Sıçan ovaryumunda (A) erken primer folikül (yeşil ok) içindeki primer oosit (ok başı) ve geç primer folikül (mavi ok) ve ona ait zona granuloza tabakası (kırmızı ok) görülmekte. Bir diğer kesitte (B) atretik folikül (ok başı) izlenmekte (H&E x400)	36
Resim 7. Sıçan ovaryumunda (A) sekonder folikül (yeşil ok), zona pellusida (mavi ok) ve antrum (yıldız) görülmekte. Bir diğer kesitte (B) ise Graaf folikülü (siyah ok), kümülüs ooforus (pembe ok), korona radiata (ok başı), oosit(ay), granuloza tabakası (kırmızı çift yönlü ok), teka tabakası (sarı çift yönlü ok) izlenmekte (H&E, x400)	37
Resim 8. Kontrol grubuna ait normal ovaryum dokusunu temsil eden bir kesitte korpus luteum (ay) ve sekonder folikül içinde oosit (mavi yıldız) görülmekte (HE, X200)	39
Resim 9. MTX grubuna ait bir kesitte yoğun vazokonjesyon (sarı yıldız) dikkati çekmekte (HE, X200)	39
Resim 10. Karayemiş grubuna ait sağlıklı ovaryum dokusunda korpus luteum (ay) ve bir oosit (mavi yıldız) görülmekte (HE, X200)	40
Resim 11. MTX+Karayemiş grubunda vazokonjesyonun (sarı yıldız) hafiflediği izlenmekte (HE, X200)	40
Resim 12 Kontrol grubuna ait bir kesitte folikül (yeşil ok), oositi çevreleyen zona pellusida (mavi ok) ve korpus luteum (ay) görülmekte (Masson Trikrom, x200)	41

- Resim 13.** Resim 13. MTX grubuna ait bir kesitte oositi çevreleyen zona pellusida (mavi ok) ve yoğun fibröz doku ve kollajen (yıldız) artışı görülmekte (Masson Trikrom, X200) 41
- Resim 14.** Karayemiş grubuna ait sekonder folikülü (yeşil ok), mavi ile boyanmış zona pellusida (mavi ok) ve korpus luteum (ay) görülmekte (Masson Trikrom, X200) 42
- Resim 15.** MTX+Karayemiş grubunda MTX grubuna göre kollajen ve fibröz doku (yıldız) artışı geriledi. Tersiyer folikül içinde mavi boyanmış zona pellusida (mavi ok) ile çevrili oosit görülmekte (Masson Trikrom, x200) 42
- Resim 16.** Kontrol grubunda, normal folikül hücresi (kırmızı ok) ve az sayıda apoptotik hücre (mavi ok) görülmekte (TUNEL x 400) 44
- Resim 17.** MTX grubunda apoptotik hücre (mavi ok) artışı ve az sayıda normal folikül hücresi (kırmızı ok) izlenmekte (TUNEL x 400) 44
- Resim 18.** Karayemiş grubunda normal folikül hücresi (kırmızı ok) ve az sayıda apoptotik hücre (mavi ok) görülmekte (TUNEL x 400) 45
- Resim 19.** MTX+Karayemiş grubunda MTX grubuna göre apoptotik hücre (mavi ok) sayısında azalma ve normal folikül hücre (kırmızı ok) sayısında artış izlendi (TUNEL x 400) 45

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

8-OHdG	8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
AICAR	Amino-imidazol karboksamit ribonükleotid
AI	Apoptotik indeks
AMH	Anti müllerian hormon
CAT	Katalaz
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH.	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FRAP	Demir (III) indirgeme yöntemi
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GPx	Glutasyon peroksidaz
GRx	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
H&E	Hematoksilen ve eozin
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IM	Işık mikroskopu
i.p.	İntraperitoneal
JIA	Juvenil idiyopatik artrit
KE	Kuarsetin eş değeri
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
KTÜCAM	Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi
LP	Lipid peroksidasyon
MDA	Malondialdehid
MTX	Metotreksat
OSİ	Oksidatif stres indeksi
OMİ	Oosit maturasyon inhibe edici faktör
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
pH	Hidrojenin gücü
R²	Korelasyon katsayısı
RAT	Reaktif azot türleri

ROT	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SC₅₀	Radikali yarıya indiren numune konsantrasyonu
SD	Standart deviasyon
SOD	Süperoksit dismutaz
TAS	Toplam antioksidan seviye
TOS	Toplam oksidan seviye
TPTZ	Tripridiltiazin
TUNEL	Terminal Deoxynucleotid Transferase Deoxyuridine Triphosphate Nick End Labeling Assay
UV	Ultraviyole
UV-Vis	Ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi
Simgeler	
%	Yüzde
µg	Mikrogram
cm	Santimetre
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
m	Metre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
n	Birey sayısı
N	Normalite
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
ppm	Milyonda bir
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar

Formüller

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Amonyum sülfat
OH	Hidroksil radikali
$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$	Alüminyum nitrat
CH_2	Metilen
CH_3	Metil
CuCl_2	Bakır (II) klorür
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Bakır (II) sülfat pentahidrat
Fe	Demir
H_2O_2	Hidrojen peroksit
H_2SO_4	Sülfürik asit
H_3PO_4	Fosforik asit
KCl	Potasyum klorür
KH_2PO_4	Mono potasyum fosfat
Mo	Morin
N	Azot
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Disodyum hidrojenfosfat dihidrat
NaOH	Sodyum hidroksit
NH_2	Amin
$\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$	Amonyum asetat
O_2	Oksijen
O_2	Süperoksit
$\text{ROO}^{\bullet}$	Peroksil radikali

1. ÖZET

Erişkin Sıçan Ovaryumunda Metotreksat Hasarına Karşı Karayemişin Etkileri

Bu çalışmanın amacı kemoterapötik bir ilaç olan metotreksat (MTX)'in ovaryumlar üzerinde oluşturacağı oksidatif hasarı ve antioksidan özelliğe sahip olduğu rapor edilmiş olan karayemişin MTX'in oluşturduğu hasara karşı olası etkilerini göstermektir. Çalışmada 24 adet Sprague Dawley ırkı erişkin dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar eşit sayıda olmak üzere dört gruba ayrıldı. Kontrol grubuna deney süresince herhangi bir uygulama yapılmadı. MTX ve MTX+karayemiş grubuna deneyin birinci günü tek doz MTX (30 mg/kg) intraperitonel olarak enjekte edildi. MTX+karayemiş ve karayemiş gruplarına 5 gün boyunca her gün aynı saatte karayemiş meyvesi ile hazırlanan ekstrakt (10 g/kg) gavaj yöntemi kullanılarak verildi. Çalışmanın bitiminde ovaryumları çıkarılan sıçanlar sakrifiye edildi. Sağ ovaryum dokuları rutin doku takip işlemlerinden geçirilerek bloklandı. Elde edilen parafin bloklardan alınan kesitler Hematoksilen Eozin ve Masson Trikrom ile boyandı. Histopatolojik değerlendirmeler ve folikül sayımları yapıldı. Apoptozu değerlendirmek için TUNEL yöntemi kullanıldı. Sol ovaryum dokularında biyokimyasal olarak oksidatif stres parametreleri, DNA oksidasyonu ve ovaryum rezerv belirteci incelendi. MTX grubuna ait apoptotik indeks (AI) kontrol ve karayemiş gruplarına göre arttı. MTX+karayemiş grubundaki AI kontrol grubuna göre artarken; MTX grubuna göre ise azaldı. Atretik folikül sayısının MTX grubunda kontrol ve MTX+karayemiş grubuna göre yüksek olduğu; primordiyal folikül sayısının ise karayemiş grubunda kontrol ve MTX grubuna göre yüksek olduğu gözlemlendi. MTX grubuna ait malondialdehit (MDA), toplam oksidan seviyesi (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ) ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri kontrol grubuna göre artmışken; katalaz (CAT) ve antimüllerian hormon (AMH) düzeylerinin düştüğü tespit edildi. MTX+karayemiş grubunun MDA, OSİ ve 8-OHdG düzeyleri MTX grubuna göre azalırken CAT ve AMH düzeyleri arttı. Sonuç olarak çalışmamız; karayemiş ekstrakt takviyesinin MTX'in sıçan ovaryumunda neden olduğu oksidatif stresi, folikül hücre apoptozunu ve folikül atrezisini azaltarak ovaryum rezervini korumaya yardımcı olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, karayemiş, metotreksat, ovaryum, sıçan

2. SUMMARY

The Effect of Cherry Laurel Against the Methotrexate Damage in Adult Rat Ovaries

The aim of this study is to show the oxidative damage of methotrexate (MTX) on ovaries and the possible effects of cherry laurel extract, reported to be an antioxidant, on the damage caused by MTX. 24 Sprague Dawley adult female rats were used and they were divided into 4 groups equal in number. No procedure was applied to the control group. On the first day of study, a single dose of MTX (30 mg/kg) was injected intraperitoneally to the MTX group and the MTX+cherry laurel group. For 5 days, at the same hour on each day, the extract (10 g/kg) prepared from the fruit of cherry laurel was given orally gavage to the MTX and MTX+cherry laurel groups. At the end of the study, the rats were sacrificed. The right ovary tissues were applied routine tissue processing. The sections from paraffin blocks are stained with Hematoxylin Eosin and Masson Trichrome. The histopathological evaluations and follicle counting were performed. For the evaluation of apoptosis, the TUNEL method was used. Oxidative stress marker levels, DNA oxidation and indicator of ovarian reserve were evaluated biochemically in left ovary tissues. The apoptotic index (AI) of MTX group was increased compared to the control and cherry laurel groups. AI of MTX+cherry laurel group was increased compared to the control group, although it is decreased when compared to the MTX group. Atretic follicle number was greater in MTX group than in control group and MTX+cherry laurel group. Primordial follicle number was greater in cherry laurel group than in control group and MTX group. It is observed that the malondialdehyde (MDA), total oxidant levels (TOS), oxidative stress index (OSI) and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) levels of MTX group were increased compared to the control group while catalase (CAT) and Antimullerian hormone (AMH) levels were decreased. The MDA, OSI and 8-OHdG levels of MTX+cherry laurel group were decreased compared to the MTX group while CAT and AMH levels were increased. As a result, our study concludes that the supplement of cherry laurel extract can attenuate the oxidative stress and the follicle cell apoptosis in rat ovaries originating from MTX, and it also may help to protect ovary reserves by decreasing follicle atresia.

Key Words: Antioxidant, cherry laurel, methotrexate, ovary, rat

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, inme ve koroner kalp hastalıklarının tümünden daha fazla ölüme sebep olmaktadır. Akciğer, meme ve kalın bağırsak kanseri en yaygın kanser türleri arasında yer alır (1). Araştırmalara göre 2012 yılında elde edilen verilerde 1.7 milyon meme kanseri teşhis edilmiş ve bu vakaların 700 bini ölümle sonuçlanmıştır (2). Metotreksat (MTX), meme, akciğer, mesane kanseri, osteojenik sarkom ve akut lenfoblastik lösemi tedavilerinde kullanılan kemoterapötik bir ajandır (3). Ayrıca çok sayıda hematolojik rahatsızlıkların, romatoid artrit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde de yaygın bir şekilde kullanılır (4). MTX'in toksik etkileri hastadan hastaya değişkenlik gösterebilir. Bu yüzden MTX geniş bir doz aralığında kullanılmaktadır (3). Tüm bunlara rağmen, MTX'in neden olduğu toksisitenin mekanizmaları günümüzde tam olarak tespit edilememiş olup; oksidatif stresle ilgili çeşitli hipotezler ortaya sürülmüştür (5). Yapılan çalışmalar çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılan MTX'in; vücudun antioksidan savunma sistemini bozduğunu göstermiştir (6).

Karayemiş ya da taflan; antioksidan özellik gösteren ve Türkiye'nin kuzey kıyı bölgesinde yetişen yaprak dökmeyen bir ağaç türüdür. Rosaceae (Gülğiller) familyasına mensup olup, Latince olarak *Laurocerasus officinalis* Roem. (Sinonim: *Prunus laurocerasus* L.) olarak isimlendirilir (7). Karayemiş meyveleri Doğu Karadeniz bölgesinde daha çok taze meyve ve meyve suyu, pekmez, reçel, kuru meyve ve turşu olarak tüketilir (8). Karayemişin çekirdeği ve meyvesi halk arasında sindirim sistemi şikayetlerinde, idrar söktürücü, mide ülseri, bronşit, egzama ve hemoroid tedavilerinde kullanılmaktadır (9).

Karayemişin taze yaprakları ise bu bölgede ağrı kesici, ateş düşürücü olarak ve boğaz ağrısını tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır (10). Yapılan bir çalışmada, karayemiş yaprağının antiinflamatuvar ve antinosiseptif etkisinin olduğu rapor edilmiştir (11). Olgun meyvesi yüksek düzeyde fruktoz ve glukoz vanilik asit, linoleik asit ve fenolik asit içermektedir (9). Yapısında bulunan askorbik asit, karayemişe oldukça iyi düzeyde antioksidan kapasite sağlamaktadır (12).

Literatürde; antioksidan özelliğe sahip karayemişin MTX'in ovaryumlarda yapacağı oksidatif hasara karşı etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu nedenle çalışmamızda yöresel, ucuz ve kolay bulunan bir ürün olan karayemiş

meyvesinin doğal antioksidan özelliği ile MTX kaynaklı ovaryum hasarında muhtemelen iyileştirici etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

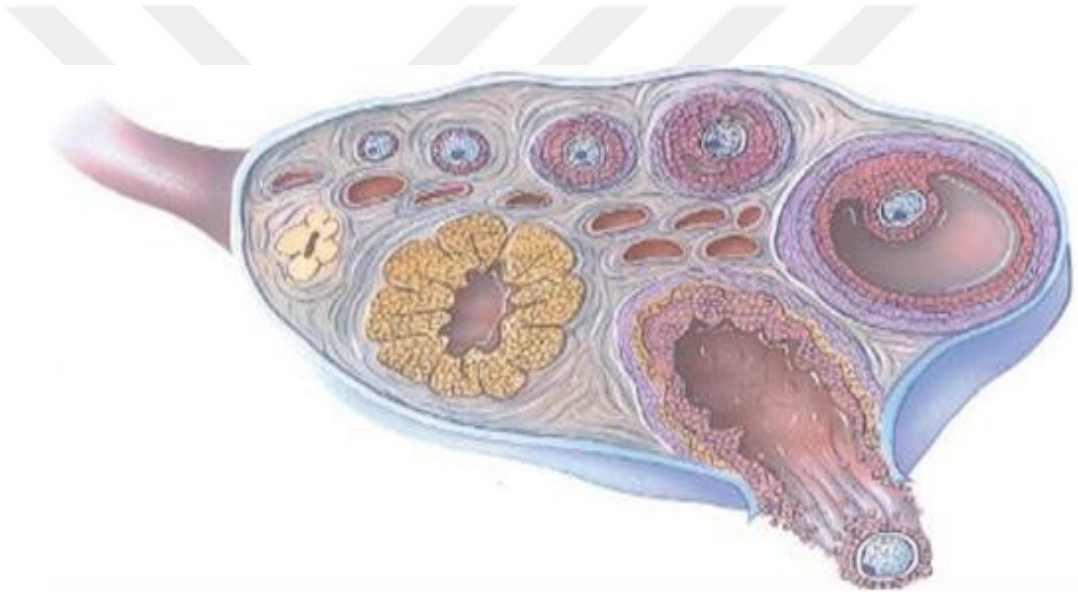


4. GENEL BİLGİLER

4.1. Ovaryum

Memeli ovaryumu, dişi germ hücre gelişimini kontrol eden, depolayan ve olgun oositleri ovidukta bırakan ve her siklusta farklı hormonların, yardımcı faktörlerin etkisiyle morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri yaşayan dinamik bir organdır (13, 14).

Ovaryum, üreme ömrü boyunca oosit gelişimi ve olgunlaşması için optimal ortamı sağlayan ve kadın fertilitasını düzenleyen kompleks bir endokrin ve parakrin bezdir (15) (Şekil 1).



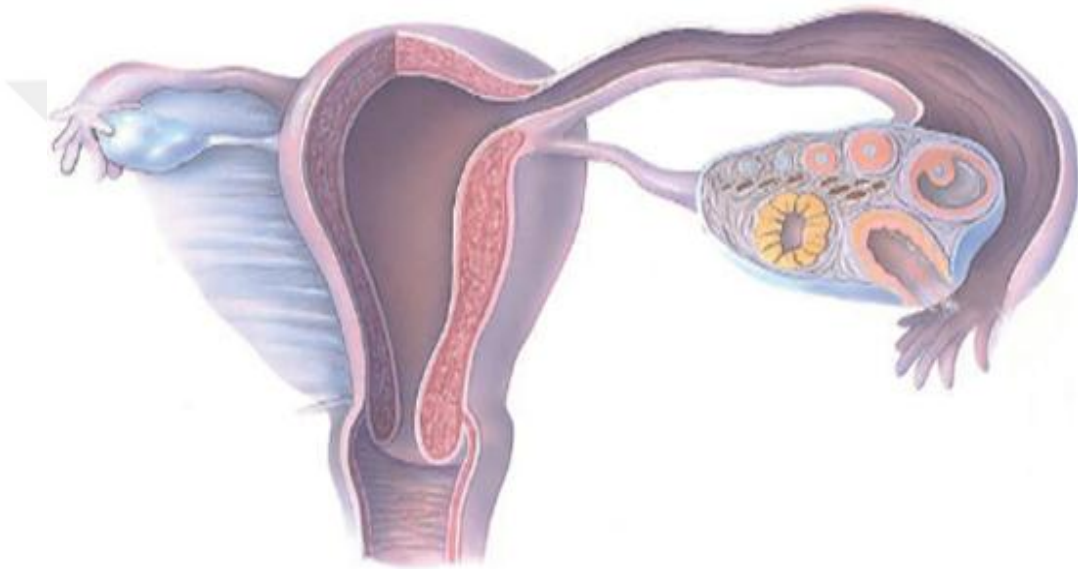
Şekil 1. Ovaryum yapısı (Gartner'dan, 16)

4.1.1. Ovaryum Anatomisi ve Histolojisi

Ovaryum badem şeklinde bir organ olup, posterior pelvik duvarında fossa ovarica adlı çukurun içine yerleşiktir. Ovaryumlar pelvik kavitede uterusun her iki yanında yaklaşık 3 cm uzunluğunda 1,5 cm genişliğinde ve 1 cm kalınlığında olan oval yapılardır (17, 18). Mezovaryum, kan damarlarını ovaryumlara ileten bir periton kıvrımı olup ovaryumu uterusun yan kenarlarından uzanan broad ligamentine bağlar. Ovaryumun üst kutbu suspansory ligamentle pelvik duvara, alt kutbu ise ovarian ligament ile uterusu tutunur (18) (Şekil 2).

Homoloğu olan testiste olduğu gibi ovaryumun kapsülü tunika albuginea olarak adlandırılır. Korteks, ovaryum foliküllerinin bulunduğu kısımdır, bunların her biri çok sayıda küçük folikül hücreleriyle çevrili gelişmekte olan oositten oluşur. Medulla ise; ovaryumların ana arterlerin ve venlerin bulunduğu fibröz bağ dokusu kısmıdır. Testis gibi tübül sistemi yoktur. Oositler foliküllerin çatlamasıyla birer birer salınır (18).

Ergenlikten önce, yumurtalık yüzeyi pürüzsüz ve homojendir. Ancak, tekrarlanan ovulasyonlar yüzeyi giderek daha kaba ve düzensiz hale getirir (19).



Şekil 2. Ovaryum anatomisi (Gartner'dan, 16)

4.1.2. Ovaryum Embriyolojisi

Primordiyal germ hücreleri embriyonik dönemde epiblasttan köken alır ve yolk kesesi endoderm hücreleri arasına göç ederler. Beşinci haftada bu hücreler genital kabartıya ulaşmaya başlar ve bu yolculuktan önce ve yolculuk sırasında genital kabartı epiteli proliferer olur. Alttaki mezenşime girerek düzensiz şekilli, yüzeyle ilişkisi devam eden primitif seks kordonlarını oluşturur ve primordiyal germ hücreleri dişi genetik yapıda oogonyumlara farklılanır.

Oogonyumlar mitozla çoğalır, bazıları ise 1. Mayozun profaz evresinde duraklar. Bunlar primer oositlerdir. Beşinci aya kadar sayıları yüz milyona ulaşır ve sonra hızla atreziye uğrarlar. Doğumda ovaryumlarda ~600-800 bin primer oosit mevcuttur.

Puberte başlangıcında oosit maturasyon inhibe edici faktör (OMİ) sayesinde 1. mayozun profazında bekleyen 40 bin primer oosit bulunmaktadır.

Dişi embriyolarında gonadal gelişimin erkek embriyolarına göre daha yavaş olduğu bilinir. XX cinsiyet kromozomlu dişi ve tamamlayıcı Y kromozomu olmayan embriyoların primitif seks kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrılır. Primitif germ hücresi grupları içeren bu kümeler, ovaryumdaki medullar kısmı işgal eder. Daha sonra ortadan kaybolur ve yerini ovaryum medullasını oluşturan vasküler stroma (ovarian medulla) alır. Dişi gonadların yüzey epiteli, erkeklerin aksine prolifer olmaya devam eder. 7. haftada kortikal kordonlar adı verilen sekonder nesil kordonlar üretir ve temel mezenşime nüfuz eder, ancak yüzeye yakın kalır. Üçüncü ayda bu kordonlar, izole hücre kümelerine ayrılır. Bu kümelerdeki hücreler çoğalmaya ve her oogonyumu, foliküler hücreler olarak tanımlanan bir epitel hücresi tabakasıyla çevrelemeye başlarlar. Oogonyum ve etrafındaki foliküler hücreler primordiyal folikülü oluşturur.

Bu nedenle, bir embriyonun genetik cinsiyetinin; fertilizasyon sırasında, spermiyumun taşıdığı X veya Y kromozomuna bağlı olarak belirlendiği söylenebilir. XX cinsiyet kromozom konfigürasyonuna sahip embriyolarda, gonad regülasyonunun medüller kordonları geriler ve sekonder nesil kortikal kordonları gelişir (20).

4.1.3. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi

Doğum ve olgunluk arasındaki zaman aralığında yumurtalık, basit bir organdan çok biçimli ve oldukça farklılaşmış bir organa doğru gelişir. İnfant ve juvenil döneminde ovaryum durgun bir organ değildir, sürekli büyüme, farklılaşma ve dejenerasyon meydana gelir (21) (Şekil 3).

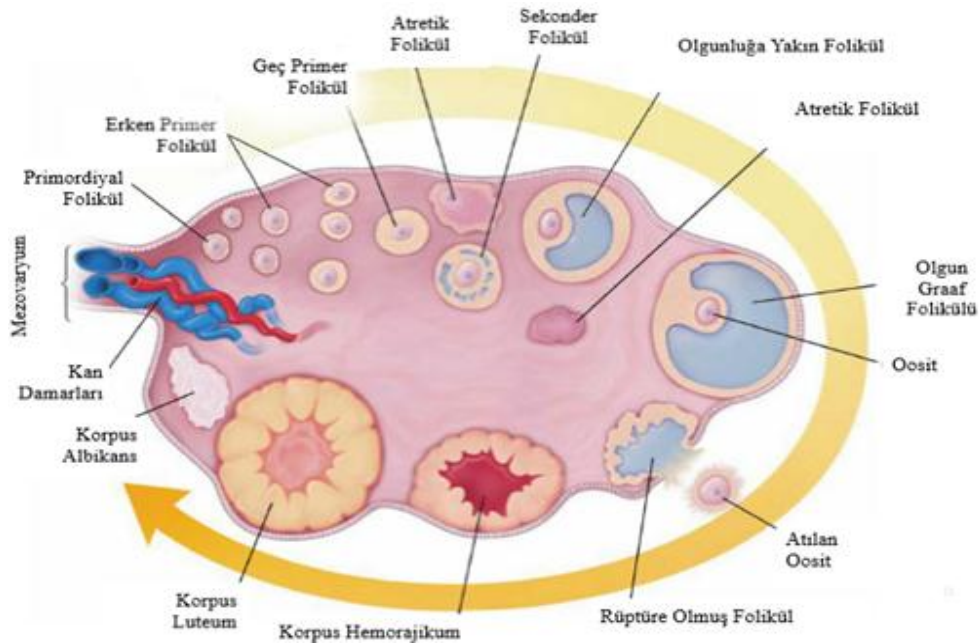
Başlangıçta, dişi yumurta gelişimsel yolculuğuna primordiyal folikülde oosit olarak başlar. Çoğu memelide, ovaryumda bulunan primordiyal foliküllerin havuzu ya primatlarda olduğu gibi embriyonik gelişme sırasında ya da kemirgenlerde olduğu gibi doğumdan hemen sonra oluşturulur. Bu oosit kümesi, dişinin sahip olacağı ve potansiyel olarak yumurtlayabileceği, yenilenemez oositlerin tam tedarikini temsil eder. Her üreme döngüsü sırasında (kadınlarda/primatlardaki adet döngüsü ve diğer memelilerde östrus döngüsü) hipofizer hormonların değişimi folikül gelişimini başlatır. Her geçen gün büyümeye başlayan foliküllerin sayısı yaşam boyunca değişir ve esasen, havuzdaki foliküllerin sayısı ile ilişkili gibi görünür. İnfant primatında veya prepubertal

farede olduğu gibi bu havuz ne kadar büyük olursa, büyümeye başlayan foliküllerin sayısı o kadar fazladır. Oositlerin (yani primordiyal foliküllerin) temini azaldığında veya bittiğinde, doğal döngüsellik sona erer. Böylece, dişi primatlar menopoza girerken, kemiriciler devamlı olarak üretken olmayan kalıcı bir vajinal östrus veya diöstrus evreye girerler (14).

Doğumda ovaryum esas olarak iki tip hücreden oluşur; özelleşmiş oositler ve multipotansiyel stroma hücreleri. Multipotansiyel, yani daha sonra ortaya çıkan granüloza hücreleri, teka hücreleri, lutein hücreleri ve diğerleri morfolojik olarak farksız hücrelerden oluşan bu havuzdan gelmelidir. Yaklaşık 5 haftalık zaman aralığında (doğumdan olgunluk başlangıcına kadar), ovaryum sadece büyümekle kalmaz aynı zamanda büyük foliküller gibi komplike cisimlerin oluşumuna yol açan kayda değer bir gelişme gösterir (21).

Doğumda ovaryum, germ hücreleri içeren primordiyal foliküller ve stroma ile dolu sağlam bir organdır. Puberteye kadar değişmeden kalır. Organ, düzgün yüzey epiteli ile kaplıdır (21).

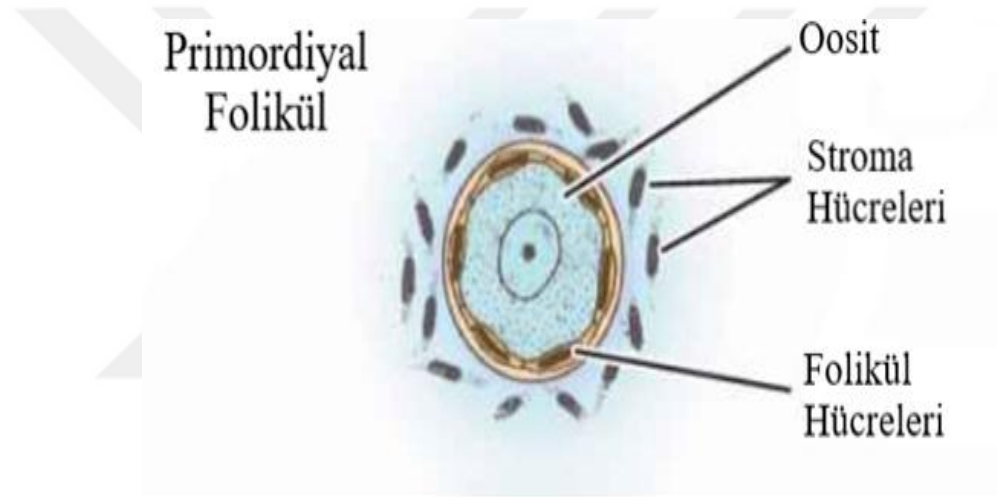
Ovaryum foliküllerinden her ay seçilen küçük bir grupta puberteden başlayarak foliküler büyüme süreci başlar. Ovaryum folikülleri primordiyal folikülden başlayan sırasıyla primer, sekonder, Graaf folikül aşamaları gelişir (22).



Şekil 3. Folikül gelişimi (Ross ve Pawlina'dan, 22)

4.1.3.1. Primordiyal Folikül

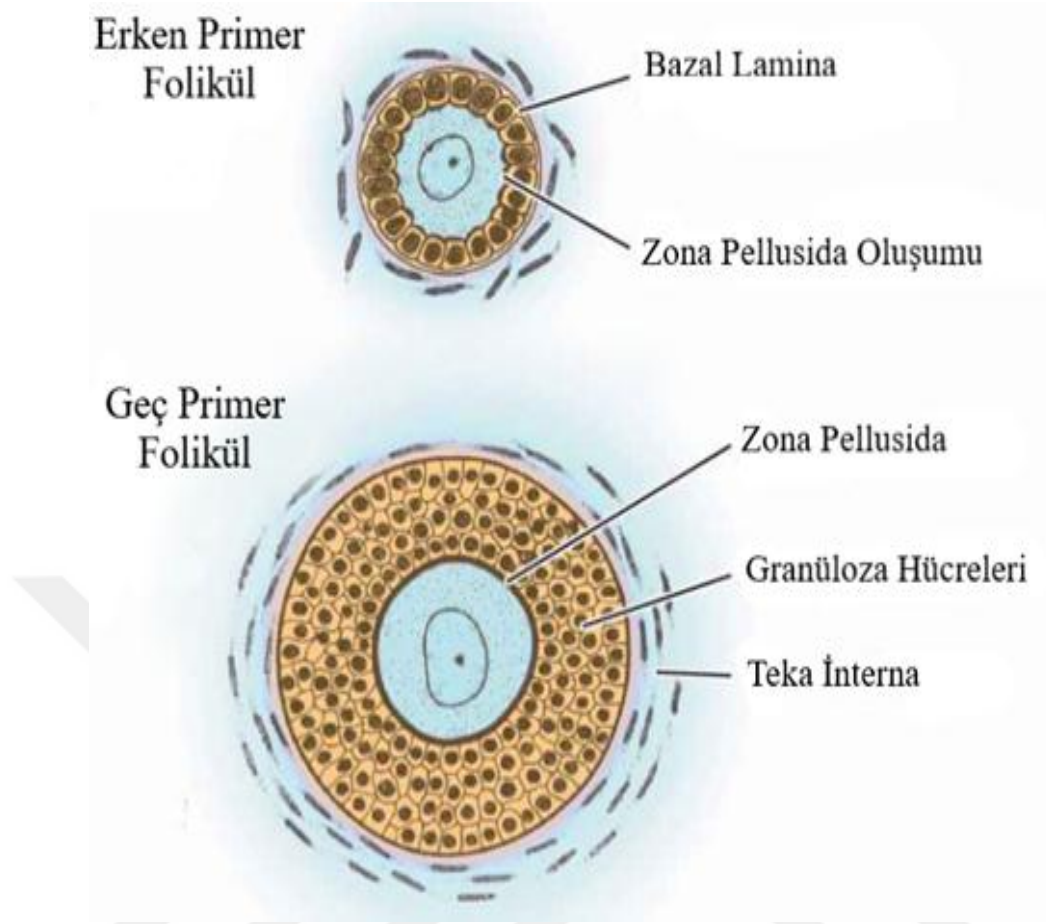
Folikül gelişiminin en erken evresidir. Fetal gelişimin üçüncü ayında ortaya çıkar, olgun ovaryumda korteks stromasında tunika albugineanın hemen altında bulunurlar. Küçük, büyümeyen foliküller, küçük bir oosit, birkaç yassı granüloza hücresi ve bir bazal membrandan oluşur (Şekil 4). Bunlar ovaryumdaki istirahat folikülleri havuzunu temsil eder (22, 23). Oosit ince dağılmış kromatin ve bir ya da daha fazla nükleusa sahiptir. Oosit sitoplazması adı verilen ooplazma Balbiani cisimciği içermektedir (22). Doğumda çok sayıda primordiyal folikül bulunur. Ancak sadece ergenlik döneminin başlamasıyla gelişim gösterirler (24).



Şekil 4. Primordiyal folikül (Junqueira'dan, 25)

4.1.3.2. Primer Folikül

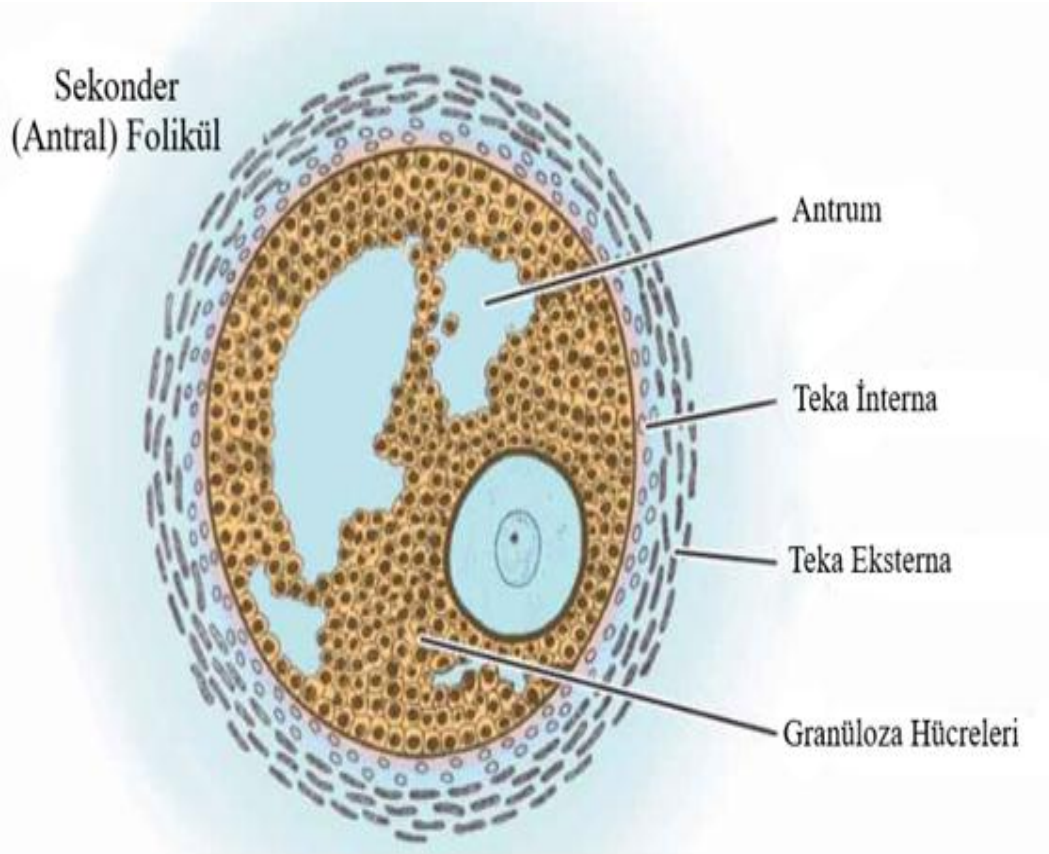
Oositin tek tabakalı kübik granüloza hücre tabakası ile çevrelenmiş foliküldür (26). Büyümekte olan folikülün gelişiminin ilk aşamasıdır. Primordiyal folikül, büyümekte olan foliküle dönüştüğünde, oositte, folikül hücrelerinde ve komşu stromada değişiklikler meydana gelir. İlk olarak oosit büyür ve oositi çevreleyen yassı folikül hücreleri proliferasyonla kübik şekil aldıktan sonra bu evrede foliküle, primer folikül denir. Oosit büyüdükçe özel proteinler salgılanır, bu proteinler bir araya gelerek oosit ile folikül hücreleri arasında zona pellusidayı oluştururlar. Tek katlı kübik belirgin folikül hücre tabakasıyla çevrelen gelişmekte olan oosit erken primer folikül, çok tabakalı granüloza hücreleri (folikül hücrelerinden farklılaşan) tarafından çevrelenen oosit, geç primer folikül olarak isimlendirilir (22) (Şekil 5).



Şekil 5. Erken primer ve geç primer folikül (Junqueira'dan, 25)

4.1.3.3. Sekonder Folikül

Preantral folikül büyüyen faza giren foliküldür. Oosit büyümeye başlar ve granüloza hücreleri oosit etrafında çoğalır. Zona pellusida şekillenir ve over stromasının hücreleri teka tabakalarına düzenlenir (23). Foliküler hücreler proliferer oldukça, büyüyen folikül bir oval şekle bürünür ve kademeli olarak kortekste daha derine geçer. Stratum granülozum 8 ila 12 hücre katmanı kalınlaştığı zaman, granüloza hücreleri arasında sıvı dolu boşluklar (likör folikülü) görülür. Likör folikülü, miktar olarak artar ve boşluklar, foliküler antrum adı verilecek olan boşluk oluşturmak üzere birleşmektedir. Likör folikülü, kan konsantrasyonları, steroidler, gonadotropik hormon ve diğer maddeleri içerir. Bununla birlikte folikül, kısmen likör folikülünün sürekli birikimine bağlı olarak, boyut olarak artmaya devam etmektedir. Oosit, folikül içine eksantrik olarak yerleştirilir (27) (Şekil 6).



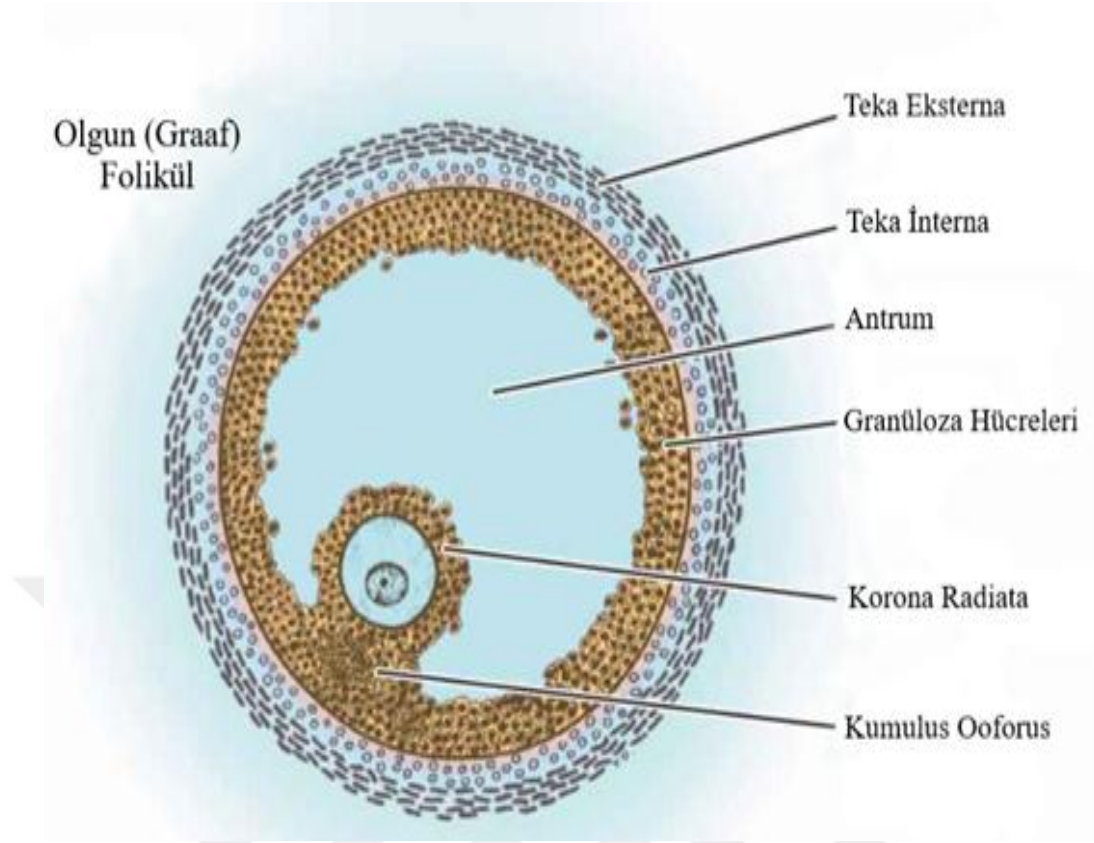
Şekil 6. Sekonder folikül (Junqueira'dan, 25)

4.1.3.4. Olgun Folikül (Graaf Folikülü)

Graaf folikülü büyük boyutundan dolayı ovaryum korteksinin kalınlığı boyunca uzanır ve ovaryumun yüzeyinde çıkıntı oluşturur, folikül maksimum boyutuna yaklaşırken granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır (22).

Tamamen damarsız, çok katmanlı granüloza hücreleri foliküler kaviteyi çevreler. Foliküler kaviteye doğru kumulus ooforus adı verilen kubbe benzeri bir çıkıntı oluşturur. Kumulus ooforus oosit içerir. Oosit, güçlü zona pellusida tarafından kaplıdır. Bütün folikül, teka folikülü oluşturan stroma hücreleri tarafından sarılır (28).

Büyük antral folikül maksimum çapa ulaşan ve gonadatropinlerin preovulator artışından tamamen sorumlu foliküldür (23) ve kumulus ooforusu oluşturan sıvı dolu antruma yansıyan bir granüloza hücresiyle çevrelenir. Kumulus hücreleri, antral boşluğu kaplayan granüloza hücreleri ile sürekli. Oositi hemen çevreleyen granüloza hücreleri, korona radiatasını oluşturur ve zona pellusidayı geçerek oosite bağlanır (27) (Şekil 7).



Şekil 7. Graaf folikülü (Junqueira'dan, 25)

4.1.3.5. Atretik Folikül

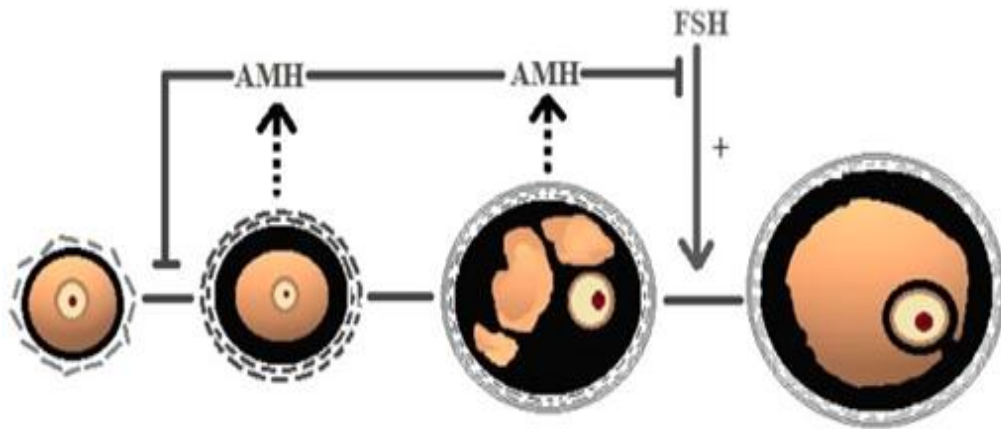
Foliküllerin çoğu fetal gelişimle başlayıp menapozda devam edecek şekilde ya primordiyal folikül evresinde ya da daha ileri foliküler gelişim evrelerinde olgun folikül aşamasına geçmeden dejenere olup atretik folikül halini alır. İlk aşamada oosit büzülür ve sitolize olur. Bunu takiben dejenerasyon sürecinde ise foliküler hücreleri piknotikleşir, birbirlerinden ayrılır ve otolize uğrarlar. Zona pellusida şişer, teka hücreleri vasküler kordonlar şeklinde düzenlenirler ve daha sonra yerlerini bağ dokusu doldurur (29, 30).

4.1.4. Ovaryum Rezervi ve Anti Müllarian Hormon

Ovaryum rezervi, yumurtalığın fonksiyonel potansiyeli olarak tanımlanır ve herhangi bir zamanda yumurtalıktaki oositlerin sayısını ve kalitesini yansıtır (31). Rezerv ovaryum folikül havuzundan oluşmaktadır ve artan yaşla birlikte azalması sonucunda üreme işlevi azalır. Folikül havuzunun büyüklüğü yaşamın erken bir noktasında kurulmuştur. Fetal yaşam sırasında germ hücreleri yumurtalığı doldurur ve

somatik hücrelerle çevrenmesiyle primordiyal foliküller oluşur. Doğumda ortalama 1 milyon oosit mevcuttur ve çocukluk döneminde azalır, menarşta ise havuz 300000-500000 arasında primordiyal folikülden oluşur (32). Yaşam boyunca bu havuzdaki primordiyal foliküllerden her bir üreme döngüsü sırasında folikül stimüle edici hormon (FSH) daki artışlar ile bir antral folikül grubunu oluşturur (33). Yapılan çalışmalar serum FSH düzeyinin önemli olduğunu gösterse de bununla birlikte, yumurtalık foliküllerinin gelişimi, tek başına FSH tarafından düzenlenmez. Östrojen (E) ve büyüme faktörleri gibi diğer ovaryan faktörler de söz konusudur. Aktivin, inhibin, büyüme ve farklılaşma faktörü 9 (GDF9) ve değiştirici büyüme faktörü- β (TGF- β) gibi büyüme ve farklılaşma faktörlerinin tüm üyeleri foliküler gelişmeyi etkileyebilir (34).

Müllerian inhibe edici madde olarak bilinen antimüllerian hormon (AMH), peptid büyüme faktörü ve büyüme ve farklılaşma faktörlerinden TGF- β süper ailesinin bir üyesidir. AMH, cinsiyet farklılaşması boyunca olan etkileriyle iyi bilinir. Kadın cinsiyet farklılaşması sırasında ovaryumda AMH ifade edilmez. AMH doğum sonrası 3. veya 4. günde fare yumurtalıklarında bulunan ve 36 haftalık gebeliğin ardından insan fetüsünde bulunan primordiyal foliküllerin granüloza hücrelerinden eksprese edilir (35). AMH, ovaryum havuzunun değerlendirilmesi için en iyi endokrin belirteç olarak bilinir. Serumdaki AMH düzeylerinin azalmasının, yumurtalıkların foliküler rezervindeki düşüşün ilk göstergesi olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Normal bir ovaryumda, AMH, olgunlaşmadan önce foliküllerin erken gelişimini yavaşlatmak ve önlemek için çalışır ovaryumlardaki oositlerini erken gelişmesini engeller (31).



Şekil 8. Ovaryumda AMH etkisinin modeli

AMH postnatal ovaryumda büyüyen foliküller tarafından üretilir ve iki etki alanı vardır. İlk folikül alımını ve FSH'a bağlı büyümeyi ve antral folikül seçimini engeller (35) (Şekil 8).

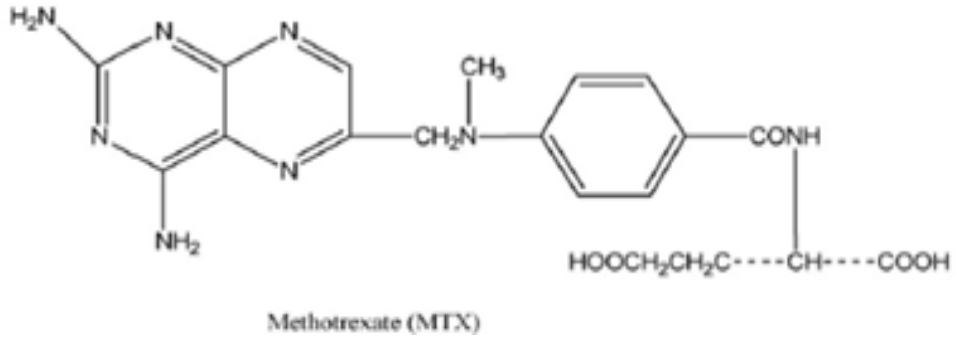
4.2. Metotreksat

Metotreksat amotepterin gibi bilinen bir folik asit analogudur. 1950'de akut lösemi, 1950-1960 yılları arasında diğer solid tümörler için kullanılan bir ilaçtır. Kontrollü çalışmalar 1980'li yıllara kadar yayınlanmasa da diğer endikasyonlar için düşük doz MTX kullanımının ilk raporları erişkin romatoid artrit için 1951'de ortaya koyulmuştur. Bu zaman zarfında juvenil romatoid artrit MTX kullanımına ilişkin ilk raporlar 1992'de Union of Soviet Socialist Republics tarafından yayınlanmıştır. MTX, juvenil idiyopatik artrit (JIA) poliartiküler seyirli tedavisinde standart haline getirilmiştir. MTX'in kanserler için etki mekanizması iyi anlaşılmış olsa da iltihaplı hastalıklardaki mekanizması sadece etkinlik keşfinden sonra açıklanmıştır. Son yıllarda, MTX kullanımı birçok uzmanlık ve anabilim dallarını kapsayacak şekilde hızla genişlemiştir (36).

Metotreksat, solid tümörler ve hematolojik kanserlerin yanı sıra inflamatuvar ve otoimmün hastalıkları içeren sayısız hastalık tedavisinde kullanılan en başarılı ilaçlardan biridir (37).

4.2.1. Kimyasal Yapısı

MTX (2,4-diamino-N10-metil propil glutamik asit), sınırlı terapötik etkisi olan yaygın olarak kullanılan bir bikarboksilat antimetabolitidir (38, 39, 40) (Şekil 9). MTX, folik asidin yapısal bir analogisidir ve pteridin grubu ve para-aminobenzoit asit yapısında sübstitüsyonlara sahiptir (41). MTX anti-inflamatuvar ve anti-proliferatif etkilere sahip anti-folat bir ilaçtır.



Şekil 9. MTX'in moleküler yapısı (Padmanabhan'dan, 42)

4.2.2. Etki Mekanizması

MTX'in etki mekanizması hakkında halihazırdaki anlayış eksik olsa da düşük doz MTX'in hücre bölünmesini büyük ölçüde inhibe ettiği açıktır. MTX, amino-imidazol karboksamit ribonükleotid (AICAR) transformilaz enzimi de dahil olmak üzere pürin ve pirimidin sentezinde yer alan folat yolundaki birkaç enzimi inhibe eder. Bu da novo pürin sentezini engeller ve AICAR'ın birikimini teşvik eder. AICAR, adenozin monofosfat deaminazını inhibe eder ve sonuç olarak hücre dışı adenozini arttıran hücre içi adenozin monofosfat birikimi ile sonuçlanır. Adenozinin, MTX'in belirli alana anti-inflamatuar etkilerine büyük katkıda bulunduğu düşünülmektedir (36).

4.2.3. Yan Etkileri

Metotreksat, nükleik asitlerin, timidilatların ve proteinlerin sentezini inhibe eder. Böylece malign ve bazı kanserli olmayan hücrelerde büyümeyi ve proliferasyonu baskılayarak özellikle hızla bölünen hücreler üzerinde toksik etkiye neden olur (43). MTX' in en iyi bilinen yan etkilerinden bazıları hematolojik, hepatik ve pulmoner toksisite olarak sıralanmıştır (44). Bazı raporlar MTX'in iskelet büyümesi, nöro, nefro ve üreme sistemleri üzerindeki toksik etkilerini tanımlamaktadır (43). Bunların yanı sıra gastrointestinal semptomlar (bulantı, dispepsi, stomatit ve diyare), dermatolojik semptomlar (deri döküntüleri, alopesi) ve hafif merkezi sinir sistemi semptomları (konfüzyon, baş ağrısı, konsantrasyonda zorluk) da görülmektedir (44). Meydana gelen yan etkilerin çoğunda MTX'in etkisiyle tetiklenen oksidatif stresin rolü olduğu bildirilmiştir (45).

4.3. Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Vücuttaki, hücrelerin enerji üretme süreçlerinin bir parçası olarak sürekli oksijen ile kimyasal reaksiyonlar oluşur. Bu kimyasal reaksiyonlar, moleküllerin oksidasyonunu ve indirgenmesini içerir. Bu aktivitenin bir sonucunda oluşan, yüksek derecede reaktif moleküller serbest radikaller olarak bilinir. Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip olan bağımsız ve kararsız bir kimyasal türdür. Biyolojik serbest radikaller, çeşitli organik substratlarla reaksiyona girebilecek elektronları olan yüksek ölçüde kararsız moleküllerdir (46).

Serbest radikaller vücudun normal oksijen kullanımı ile sürekli olarak üretilir (47). Oksijen, yaşam için vazgeçilmez bir elementtir. Hücreler enerji üretmek için oksijen kullandığında mitokondri tarafından serbest radikal üretilir. Bu yan ürünler, genellikle hücresel redoks işleminden kaynaklanan reaktif azot türleri (RAT) ve reaktif oksijen türleridir (ROT). Serbest radikaller lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler için özel bir afiniteye sahiptir (48).

Serbest radikaller arasında hidroksil, süperoksit, nitrik oksit, azot dioksit, peroksil ve lipid peroksil bulunur. Ayrıca oksidanlar olarak adlandırılan, hidrojenperoksit, ozon, singlet oksijen, hipokloröz asit, nitroz asit, peroksinitrit, dinitrojen trioksit, lipid peroksit serbest radikal olmamalarına rağmen bunlar da canlı organizmalarda serbest radikal reaksiyonlara yol açabilirler (49).

Subselüler organellerde bulunan membran lipidleri serbest radikal hasarına oldukça duyarlıdır. Serbest radikallerle reaksiyona girdiğinde lipidler hem doğrudan hem de dolaylı etkilere yol açan zincirleme lipid peroksidasyonunun (LP) yüksek oranda zararlı etkilerine maruz kalabilir. LP süreci sonunda, malondialdehid (MDA), 4-hidroksinenal ve çeşitli alkenler gibi birçok sekonder veya son ürün oluşur (50).

Normal hücresel metabolizmanın bir sonucu olarak canlı organizmalar tarafından üretilen ROT'un, biyolojik sistemlerde ortama ve konsantrasyona bağlı olarak hem zararlı hem de faydalı olabileceği tespit edilmiştir. Düşük ila orta konsantrasyonlarda, fizyolojik hücre süreçlerinde çalışan ROT; indirgenme ve oksitlenme (redoks) durumunun düzenlenmesi, hücre canlılığı, aktivasyon, proliferasyon ve organ fonksiyonu için kritik öneme sahiptir (51). Fakat yüksek konsantrasyonlarda, lipidler, proteinler ve deoksiribonükleik asit (DNA) gibi hücre bileşenlerine olumsuz

değişiklikler ortaya çıkabilir ve karbonhidratlar, nükleik asitler, lipidler ve proteinler gibi hücre yapılarına zarar verebilir ya da işlevlerini değiştirebilir (52). ROT' un hücre DNA'sı ile reaksiyona girmesi ile 8- Hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşur ve esas olarak DNA'nın oksidatif hasarının bir sonucu olarak üretilen üründür ve oksidatif DNA hasarını değerlendirmek için yaygın kullanılan biyomarkırlardan biridir (53).

Sonuç olarak kararsız yapıdaki ROT'un hücre içindeki moleküller ile etkileşime girmesi hücrede oksidatif hasara neden olabilir (Stres). Oksidatif stres, bir organizmada pro-oksidatif ve antioksidan dengede bir bozukluk olarak tanımlanır (46, 54).

Oksidatif stres, kanser, nörolojik bozukluklar, ateroskleroz, hipertansiyon, iske mi/ perfüzyon, diyabet, akut solunum sıkıntısı sendromu, idiopatik pulmoner fibroz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve astım dahil olmak üzere birçok patolojik duruma ve hastalığa katkıda bulunur. Ancak aerobik organizmalar, ROT'un zararlı etkilerini engellemede genellikle etkili olan enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar içeren entegre antioksidan sistemlere sahiptir (51).

Antioksidanlar bazı hücre hasarlarını önleyebilen veya geciktirebilen insan yapımı veya doğal maddelerdir. Antioksidanlar, meyveler ve sebzeler dahil olmak üzere birçok gıdada bulunur (55). İnsan vücudu, endojen veya eksojen yoluyla dışarıdan sağlanan antioksidanlar üreterek oksidatif stresi önlemeye yönelik çeşitli mekanizmalara sahiptir. Endojen ve eksojen antioksidanlar ROT kaynaklı zararları engellemek ve onarmak için serbest radikal temizleyicileri olarak etki eder ve bundan dolayı bağışıklık sistemini güçlendirip, hastalık ve kanser riskini azaltabilir. Endojen antioksidan bileşikler, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir.

ROT'un etkisizleştirmesinde doğrudan rol oynayan başlıca enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR)'dır (56).

En etkili hücre içi enzimatik antioksidanlardan biri olan SOD süperoksit anyonlarının dioksijen ve hidrojen peroksite dönüşmesini katalize eder. CAT, aerobik hücrelerin peroksizomunda bulunur ve oldukça verimli bir şekilde hidrojen peroksidin suya ve moleküler oksijene dönüşmesini sağlar. GSH ise çok işlevli bir intrasellüler antioksidan ve hücrenin ana tiyol-disülfid redoks tamponu olarak kabul edilen enzimatik olmayan antioksidanlardan biridir. Oksidatif strese karşı bir koruyucu olan GSH çeşitli

detoksifiye edici enzimler için kofaktör gibi etki edebilir, plazma membranı boyunca amino asit taşınmasına katılır ve C-E vitaminlerinin aktif formlarını geri kazandırır. Ayrıca direkt olarak hidroksil radikal ve singlet oksijen temizleyicisidir (52).

Tüm bu ve benzeri farklı antioksidanların ve oksidanların serum konsantrasyonları laboratuvarlarda ayrı ayrı ölçülebilir ilave olarak bunların toplam antioksidan ve oksidan etkilerinin olmaması nedeniyle bir numunenin toplam antioksidan ve oksidan yanıtı ölçülür. Bunlara toplam antioksidan seviye (TAS) ve toplam oksidan seviye (TOS) adı verilir (57, 58). Yani TAS genel antioksidan durumunu değerlendirmek aynı zamanda TOS'da tüm oksidasyon durumu belirlemek için kullanılır. Oksidatif stres indeksi (OSİ) TOS'un TAS'a oranı olarak değerlendirilmektedir. OSİ ise dokuda oksidatif stresin daha duyarlı bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (59).

4.4. Karayemiş

Meyveler insanlar tarafından yenilebilir ürünler olarak, şifa verici maddeler olarak veya süsleme ve estetik amaçlar için kullanılırlar. Genetik açıdan çok çeşitli bir gruptur ve modern toplum hayatında büyük rol oynamaktadırlar (60).

Laurocerasus officinalis ülkemizde çoğunlukla Karadeniz Bölgesi kıyılarında yetişmektedir. Yerel olarak "Taflan" veya "Karayemiş" olarak adlandırılan bu popüler bitkinin yaygın olarak lezzetli meyveleri tüketilmektedir (Resim 1). Kurutularak, turşu, pekmez, reçel, marmelat ve meyve suyu yapılarak da kullanılmasına rağmen çoğunlukla taze meyve olarak tüketilmektedir. Yaprakları ve meyvelerinde fenolik asitler, flavonoidler, antosiyaninler, tanenler, lignanlar ve kateşin gibi fenolik bileşiklerden bol miktarda içerir. İlaç olarak bazı nörolojik rahatsızlıklara karşı Anadolu'da çay formunda kullanılırlar. Hem gıda hem de meyve tohumları Türkiye'de geleneksel ilaçlar olarak bilinir ve mide ülserleri, sindirim sistemi şikayetleri, bronşit, egzama, hemoroit tedavisinde ve diüretik ajan olarak uzun yıllar kullanılmaktadır (61).



Resim 1. Olgunlaşmakta olan karayemiş meyvesi (Ağustos, 2017, Trabzon)

4.4.1. Karayemişin Genel Özellikleri

Karayemiş ağacı, 8-20 mm çapındaki oval yapıda siyahımsı koyu mor meyvelerle birlikte 6 m yüksekliğinde yaprak dökmeyen bir bitkidir (12). Mart ayından Nisan'ın ilk yarısına kadar çiçek açan hep yeşil kalan çalı veya küçük ağaç türüdür. Temmuz-Eylül ayları arasında olgunlaşan küçük kırmızı meyveleri taşır. Türkiye'nin kuzeyi boyunca meyveleri için yetiştirilir ve dünya çapında ılıman bölgelerde popüler bir peyzaj mimarlığı bitkisidir (62).

Geleneksel Türk tıbbında bu bitkinin yaprakları, analjezik, antispazmodik, narkotik ve sedatif etkilerin yanı sıra astım, öksürük ve dispepsi tedavisi için kullanılırken su ve etanolik ekstraktları herhangi bir gastrik lezyon oluşturmadan

antifungal, antinosiseptif ve anti-inflamatuar aktivite gösterir (62). Bitkinin yapraklarından hazırlanan çay, Anadolu'daki yöre halkı tarafından nörolojik bozukluklara karşı kullanılır (63).

İlave olarak meyvesi ve tohumunun sindirim ve solunum bozuklukları, bronşit egzama ve hemoroit tedavisinde etkili olduğu rapor edilmiştir. Karayemiş meyvesi, Doğu Karadeniz bölgesinde işlenmeden taze veya kuru halde, reçel, meyve suyu, marmelat ve alkollü içecek olarak da işlenerek yaygın olarak tüketilmektedir (62).

Tokluk veren iyi bir diyet meyvesidir. Çekirdeğiyle yenildiğinde böbrek taşı düşürme etkisi vardır. Bronşit için çekirdeklerinin tozu çok iyidir. Kan asit-baz dengesini sağlar. Karayemiş meyveleri önemli bir fenolik bileşik ve antosiyanin kaynağı olarak kabul edilir (64).

Bu meyvenin besinsel ve farmakolojik değeri; en yaygın, kükürt, glikoz, sorbitol, mannitol, askorbik asit, diyet lifi, antosiyaninler, bazı mineral ve tanen içeriği olan klorojenik, vanilik, kafeik ve benzoik asitin bulunduğu fenolik asitlerinden kaynaklanmaktadır. Bu bileşiklerin bazıları iyi bilinen antioksidanlardır (62).

Çalışmalar, karayemiş meyvesinde bulunan bileşiklerin antikanserojen etki oluşturduğunu ve farmokolojik ajanların sitotoksik etkilerini azalttığını göstermektedir (65). Aynı zamanda karayemiş meyvesinin, oksidatif stresin neden olduğu dejeneratif hastalıkların iyileştirilmesinde yararlı etkilere sahip olabileceği de bildirilmiştir (66).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Destek

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2016/37 numaralı izni ile gerçekleştirilmiştir (EK.1). Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: TYL-2017-6993).

5.2. Deney Hayvanları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı

Deney hayvanları, Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi (KTÜCAM)'dan temin edildi. Çalışmada bir hafta önce temin edilen sıçanlar ile her grupta altışar adet olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Gruplar içerisindeki bireyler rastgele seçildi, aşağıdaki şekilde düzenlendi;

- 1. Grup:** Kontrol grubu (n:6); Herhangi bir uygulama yapılmadı.
- 2. Grup:** MTX grubu (n:6); Tek doz MTX (30 mg/kg) i.p. olarak deneyin ilk günü uygulandı.
- 3. Grup:** MTX + Karayemiş grubu (n:6); Deneyin ilk günü tek doz MTX (30 mg/kg) i.p. olarak ve 5 gün boyunca Karayemiş ekstraktı (10 g/kg) oral gavaj yolu ile uygulandı.
- 4. Grup:** Karayemiş grubu (n:6); 5 gün boyunca karayemiş ekstraktı (10 g/kg) oral gavaj yolu ile uygulandı.

Çalışma süresince deney hayvanlarının tümü her grup ayrı kafeste olacak şekilde, tabanı ve yanları plastik, üstü demir tel ile kaplı standart Tip III kafeslere yerleştirildi (Resim 2). Sıçanların bakımı, beslenmesi ve barınması KTÜCAM deney hayvanları takip odalarında yapıldı. Deney süresince oda sıcaklığı $22\pm2^{\circ}\text{C}$, nisbi nem ortalama $\%50\pm5$ olarak sabit tutuldu. Işıklar 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Aynı biyolojik koşullar altında tuttuğumuz deney hayvanları kafes üzerinde kolaylıkla ulaşabileceği bölmelere yerleştirilen standart pelet yem (*ad libitum*) ve musluk suyu ile serbest beslenmeye tabi tutuldular.



Resim 2. Sıçanların çalışma süresince barındırıldığı standart tip III kafesler

5.3. Karayemiş Meyve Ekstraktının Hazırlanması

Olgun karayemiş meyvesi 2017 Ağustos ayında Trabzon, Akçaabat ilçesinden temin edildi. Çeşme suyuyla yıkanıp çekirdekleri çıkarıldıktan sonra 1500 g olarak tartılan meyvenin etli kısmı çalışma zamanına kadar -20°C 'de saklandı. Karayemiş meyve ekstraktı hazırlamak için buzluktan çıkarılan meyvelerin etli kısmı 500 g tartıldıktan sonra 750 mL su ile homojenize edildi. Karıştırıcıda 4 dakika karıştırılarak elde edilen karayemiş ekstraktının konsantrasyonu 0.07 g/mL olarak kaydedildi ve bütün hesaplamalar bu konsantrasyon üzerinden yapıldı. Elde edilen ekstrakt, deney hayvanlarında kullanılmak üzere ependorflara doldurulup $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı ve deney süresince hayvanlara belirlenen miktarda verildi (Resim 3).



Resim 3. Karayemiş ekstrakt hazırlama ve gavaj uygulaması

5.3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Karayemiş meyvesinin barındırdığı fenolik maddelerin bazik ortamda Folin-Ciocalteu reaktifi ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanan bu yöntem doğal ürünlerde toplam fenolik madde miktarının ölçümü için en çok kullanılan yöntemlerden biridir (67, 68). Folin-Ciocalteu reaktifi ile meydana gelen mor menekşe renkli kompleks maksimum 765 nm’de absorbanı verir. Standart çalışma grafiği için değişik konsantrasyonlarda (1.0; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625 ve 0.03125 mg/mL) fenolik bir madde olan gallik asit (GA) standardı kullanılmıştır. Sonuçlar mg GAE (gallik asit eşdeğeri)/g karayemiş olarak ifade edildi. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmada pipetleme işlemi Tablo 1’deki gibidir.

Tablo 1. Toplam fenolik madde miktarı pipetleme işlemi

	Kör (µL)	Standart (µL)	Numune (µL)
Distile su	700	680	680
Standart	-	20	-
Karayemiş Numunesi	-	-	20
0.2 N Folin Reaktifi	400	400	400
%10 Na₂CO₃	400	400	400

5.3.2. Toplam Flavonoid Tayini

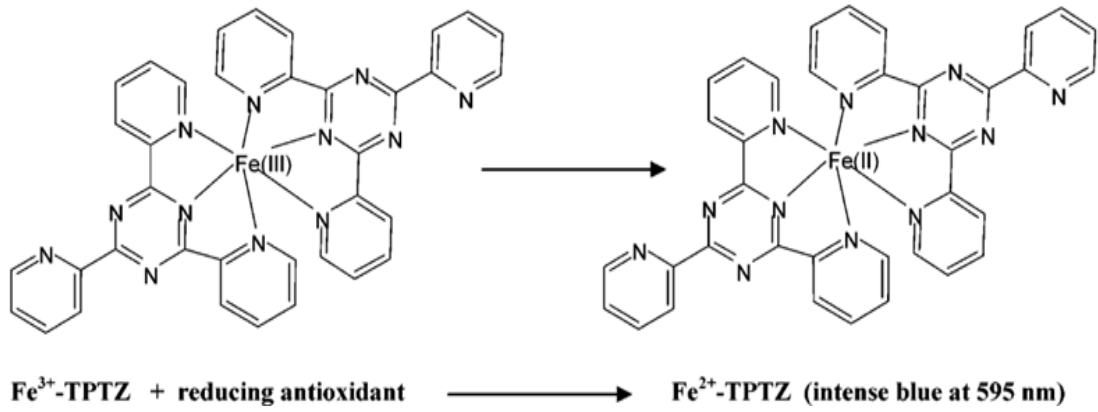
Karayemiş ekstraktında bulunan toplam flavonoid madde miktarı tayini Fukumoto ve Mazza (69)'ya göre yapıldı. Bu yöntemin ana prensibi; alüminyum klorürün, flavonoidlerin 4-keto ve C-3 ya da C-5 (ya da her ikisi) hidroksil grubu ile kararlı bir asit kompleksinin meydana gelmesine dayanmaktadır. Standart karayemişin değişen konsantrasyonlarındaki (0.25; 0.125; 0.0625; 0.03125; 0.015625 ve 0.0078125 mg/mL) çözeltileri kuersetin eşdeğeri (KE) kullanıldı. Pipetlemeler Tablo 2'de gösterildi. Sonuçlar mg KE/g olarak verildi.

Tablo 2. Toplam flavonoid miktarı pipetleme işlemi

	Kör (mL)	Standart (mL)	Numune (mL)
Numune	-	-	0.5
Standart	-	0.5	-
Saf Metanol	4.8	4.3	4.3
%10 Al(NO ₃) ₃	0.1	0.1	0.1
1 M NH ₄ .CH ₃ COO	0.1	0.1	0.1

5.3.3. Demir (III) İndirgeme Yöntemi (FRAP)

Polar moleküllerin antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde kullanılan bu yöntem çözelti ortamında bulunan Fe (III) kompleksinin antioksidan maddeler varlığından Fe (II) ye indirgenmesi esaslıdır (70) (Şekil 10). FRAP çalışma reaktifi 300 mM asetat tamponu (pH 3.6), 40 mM HCl içerisinde 10 mM tripidiltriazin (TPTZ) ve 20 mM FeCl₃.6H₂O çözeltilerinin 10:1:1 oranlarında karıştırılması ile hazırlandı. Bu çözelti günlük olarak hazırlanarak karanlıkta muhafaza edildi. 100 µL örnek ile 3 mL FRAP çalışma reaktifi 37 °C'de 4 dakika süre ile inkübe edildi. Çözeltinin absorbansı 593 nm'de 3 mL FRAP çalışma reaktifi ve 100 µL saf su içeren kör çözeltiye karşı okundu. Kalibrasyon eğrisi için konsantrasyonu bilinen demir sülfat çözeltileri (100-1000 µM) kullanıldı. Karşılaştırma yapılabilmesi için Troloks standart antioksidan olarak kullanılarak aynı koşullar altında test edildi.



Şekil 10. Ferrik-tripiridiltriazin kompleksi ile antioksidan arasındaki reaksiyon (Prior'dan, 70)

5.3.4. DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi

2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil adlı sentetik radikal (DPPH) 517 nm'de absorbans verir ve antioksidan maddeler varlığında indirgenerek absorbans kaybolur (71). 4 mg/100 mL lik DPPH radikali metanolik çözeltisi hazırlanır ve 750 µL DPPH 750 µL karayemiş ekstraktı karıştırılarak oda sıcaklığında 50 dakika bekletildi ve 517 nm'de absorbanslar okundu. Değişik numune konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan grafikten radikalın %50 sini indirgeyen numune miktarı SC₅₀ mg/mL tespit edildi.

5.3.5. Fenolik Profilinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)'de Belirlenmesi

5.3.5.1. Numunenin HPLC-UV Analizine Hazırlanması

Antioksidan analiz için hazırlanan etanolik ekstraktan 15 mL alınıp çözücüsü 40°C'deki döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve kalıntı pH'sı 2 olan 10 mL saf suda çözüldü. Daha sonra 3'er defa 5 mL'lik önce dietileter sonra etilasetatla ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilen ekstraktlar evaporatör balonlarına alındı ve çözücüler 50°C'deki döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve son olarak balon içeriği 2 mL metanolle çözülerek ekstraktlar HPLC-UV ile fenolik bileşen analizi yapılmaya hazır hale getirildi (72).

5.3.5.2. Standartlar ve Kalibrasyon

Benzoik asit türevlerinden; gallik asit, protokatekuik asit, vanilik asit, şiringik asit; flavonollardan; kateşin, epikateşin 280 nm'de; sinamik asit türevlerinden; kaffeik

asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve flavonollardan; rutin kuersetin, 315 nm’de analiz edildi.

Standart çözeltiler; gallik asit, protakatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, kaffeik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit ve ferulik asit %50-50 metanol-saf suda hazırlanan 1000 ppm’lik stok çözeltisinden 1, 2, 5, 10, 20 ve 30 ppm’lik, kateşin, epikateşin, rutin kuersetin %100 metanolle hazırlanan 1000 ppm’lik stok çözeltiden, 1-2- 5- 10- 20- 30 ppm’lik ara stok çözeltileri kalibrasyon eğrileri için kullanıldı.

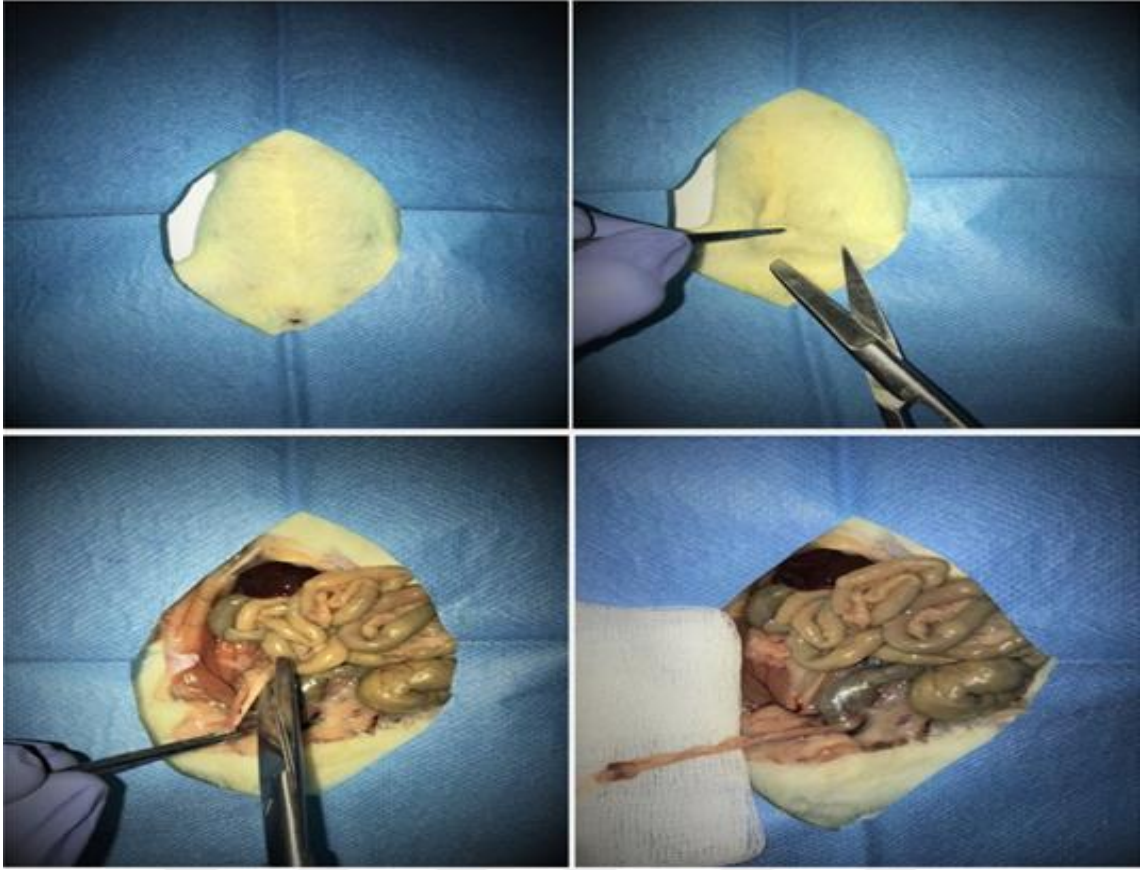
5.3.5.3. HPLC-UV Analizi

HPLC-UV analizleri iki farklı dalga boyunda (280 ve 315 nm) aynı anda cevap alınabilen UV-Vis dedektör ile donanımlı Thermo Finnigan Surveyor HPLC sistem ile yapıldı. C₁₈ kolonu ters faz kolonu (150 mm x 4.6 mm, 5µm; Fortis) kullanarak ve asetronitril, su ve asetik asitle gradient program uygulanarak gerçekleştirildi (73). A rezervuarında %2 asetik asit (saf suda) ve B rezervuarında %70-30 asetronitril (saf suda) bulunan gradient program uygulandı. Ayrıca numune ve standartların enjeksiyon hacmi 25 µL’ye, mobil faz akış hızı 1.2 mL.dk⁻¹’ya ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30°C’ye ayarlanarak çalışma optimizasyonu sağlandı.

5.4. Histolojik İşlemler

5.4.1. Ovaryumların Çıkarılması

Deney süresinin sonunda sıçanlar anestezi altındayken dorso-ventral pozisyonda diseksiyon tahtasına yatırılıp abdominal orta hattın bistiiri ile abdominal deri insizyonu yapıldı. Periton geçilerek, sağ ve sol overler ucu künt bir pens yardımıyla etrafındaki yağ tabakası ile birlikte çıkarılıp yağ tabakası ovaryum dokusuna zarar vermeyecek şekilde temizlendi (Resim 4). Daha sonra sağ ovaryumlar bütün olarak takip kasetlerine yerleştirilerek %10’luk formaldehit solüsyonunda tespit işlemine alındı. Sol ovaryumlar biyokimyasal değerlendirmeler için kullanıldı.



Resim 4. Sıçanlarda ovaryumların çıkarılma işleminin basamakları

5.4.2. Doku Takip Protokolü

Deney hayvanlarından alınan sağ ovaryum dokuları 3 günlük fiksasyon sonunda laboratuvarlarımızda bulunan tam otomatik takip cihazı (Thermo Scientific Excelsior AS, Thermo Shandon Limited, Runcorn, UK) ile rutin doku takibi yapılarak, doku gömme cihazı (Leica HistoCore Arcadia Embedding System, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Almanya) ile parafine gömülerek parafin bloklar elde edildi.

5.4.3. Hematoksilen Eozin Boyaması

Tüm dokulardan yarı otomatik mikrotom cihazı (Leica Biosystems RM2245 Semi-Automated Rotary Microtome, Leica Microsystems Ltd., Nussloch, Almanya) ile kesitler rodajlı ve histokriptli lamlara aktarıldıktan sonra önce etüvde 1 saat bekletilerek sonrada sırasıyla ksilen ve azalan dereceli alkol serilerinden geçirilerek deparafinize

edildi. Daha sonra kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ile otomatik boyama cihazında (Leica ST5010 XL, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Almanya) boyandı.

5.4.4. Over Foliküllerinin Sayımı

Her bir deney hayvanının sağ over dokusundan kesitler alınarak H&E ile boyanan preparatlarda primordiyal folikül, erken ve geç primer folikül, sekonder folikül, Graaf folikülü ve atretik foliküller belirlenerek sayıldı. Sayımlar her bir sıçan için alınan seri kesitlerden rastgele örnekleme ile seçilen 5 sayıda preparatta yapılarak ortalamaları alındı.

5.4.5. Masson Trikrom Boyaması

Masson Trikrom boyama için alınan kesitler deparafinize edildi. Daha sonra üretici firma direktifleri doğrultusunda GBL® Masson Trikrom Boyama Seti (Ürün Kodu: 5022-100, GBL Gül Biyoloji Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi, Türkiye) kullanılarak boyandı ve ardından entellan ile kapatıldı.

5.4.6. İmmünohistokimyasal Boyama

İmmünohistokimyasal değerlendirme için, parafin bloklardan 5 µm'lik kesitler alınıp TUNEL boyama tekniğiyle boyama yapıldı. Apoptozisi değerlendirmek için kullanılan TUNEL (Terminal deoxynucleotid transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay) tekniği ile ovaryum dokusu granüloza hücrelerinde DNA fragmentasyonları belirlendi. Çekirdekleri kahverengi renkte boyanmış TUNEL (+) hücreler apoptotik hücre olarak kabul edildi. Her sıçana ait 3 farklı kesitte 5 farklı alanda apoptotik hücre ve sağlıklı hücre sayıları belirlendi. TUNEL tekniği için In situ cell death detection kit, POD (Ürün Kodu: 11684817910, Roche Diagnostics, İsviçre) kiti ve kontrast için Hematoksilen boyası kullanıldı. Lam üzerine alınan 5 µm'lik kesitler 1 saat 58 °C'lik etüvde bekletildikten sonra Tablo 3'deki işlemlerden geçirildi.

Tablo 3. İmmünohistokimyasal işlemler

İşlemler	Süre
Ksilen	3 x 5 dk
%100 Etanol	5 dk
%95 Etanol	5 dk
%70 Etanol	5 dk
Distile su ile yıkandı.	
%3 H ₂ O ₂	15 dk
Distile su ile yıkandı.	
Phosphate Buffer Solutain (PBS)	2 x 5 dk
Large Volume Ultra V Işın Blok Solüsyon	10 dk
75 µg Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve 50µl TdT/dUTP karışımı ile dokuların üzeri kaplandı ve 37°C'lik etüvde bekletildi.	90 dk
PBS	2 x 5 dk
100 µl Converter peroksidaz dokuyu kapatacak şekilde damlatıldı ve 37°C'lik etüvde bekletildi.	30 dk
PBS	2 x 5 dk
100 µl DAB ile karanlıkta oda ısısında bekletildi.	3-5 dk
Distile su ile yıkadı.	
H&E ile 15 s boyanır ve çeşme suyu ile yıkandı.	
%70 Etanol	2 x 5 dk
%95 Etanol	2 x 5 dk
%100 Etanol	2 x 5 dk
Ksilen	2 x 5 dk
Kurutulup üzerine entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.	

5.5. Biyokimyasal Analiz

MTX ve karayemişin over üzerinde etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla ovaryum dokusunda biyokimyasal parametrelere bakıldı. Ovaryum dokusunda oksidatif stres belirleyicileri olarak MDA, GSH, SOD, 8-OHdG ölçümü yapıldı ve AMH seviyesi ölçüldü. Dokuda TAS, TOS ölçümü ve OSİ hesaplaması yapıldı.

5.5.1. Doku Örneklerinin Hazırlanışı

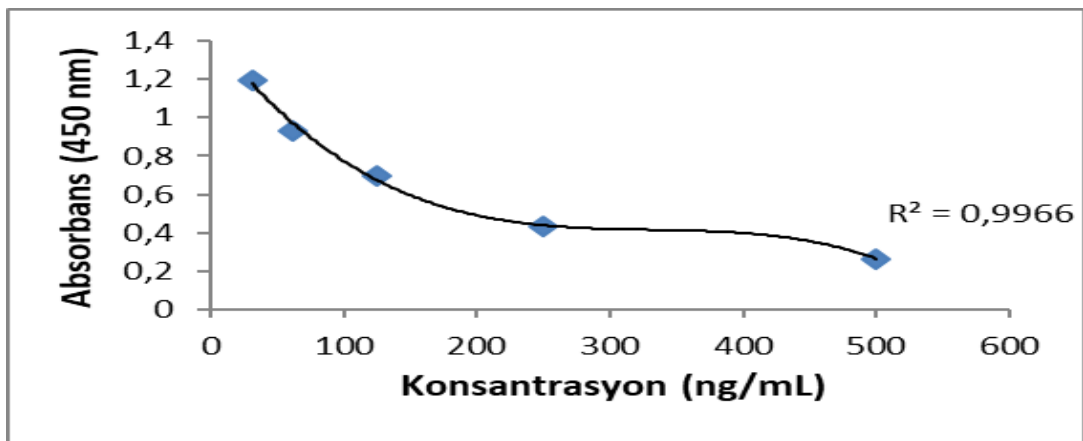
Alınan ovaryum dokuları homejenizatör (IKA Ultra-Turrax T-25, Staufen im Breisgau, Almanya) yardımıyla 1.5 mL fosfat tamponu (PBS, pH:7.4) içerisinde 9500 rpm’de homojenize edildi. Homojenatlar 4000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlarda ilgili parametrelerin ölçümü gerçekleştirildi.

5.5.2. Doku Örneklerindeki Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Doku örneklerindeki protein miktarları üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ticari kit (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, Cat No: 23227, Rockford, IL, ABD) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı. Dokularda ELISA kitleri kullanılarak ölçülen tüm biyokimyasal parametrelerin seviyeleri standardize olması açısından hesaplanan örnek protein miktarlarına oranlanarak mg protein başına olacak şekilde verildi.

5.5.3. MDA Düzeyinin Belirlenmesi

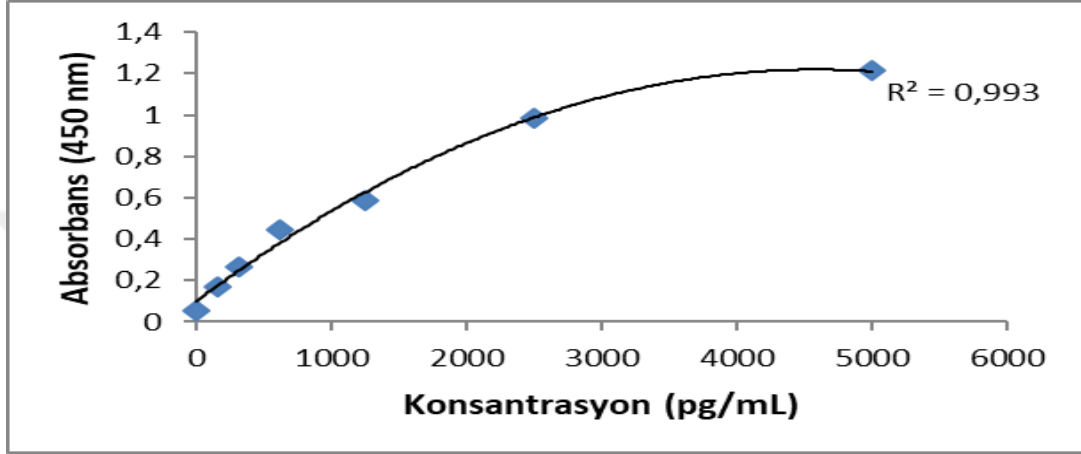
Doku örneklerinin MDA seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Elabscience, Cat No: E-EL-0060, Wuhan, Çin) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 11’de gösterildi.



Şekil 11. Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği

5.5.4. AMH Seviyelerinin Belirlenmesi

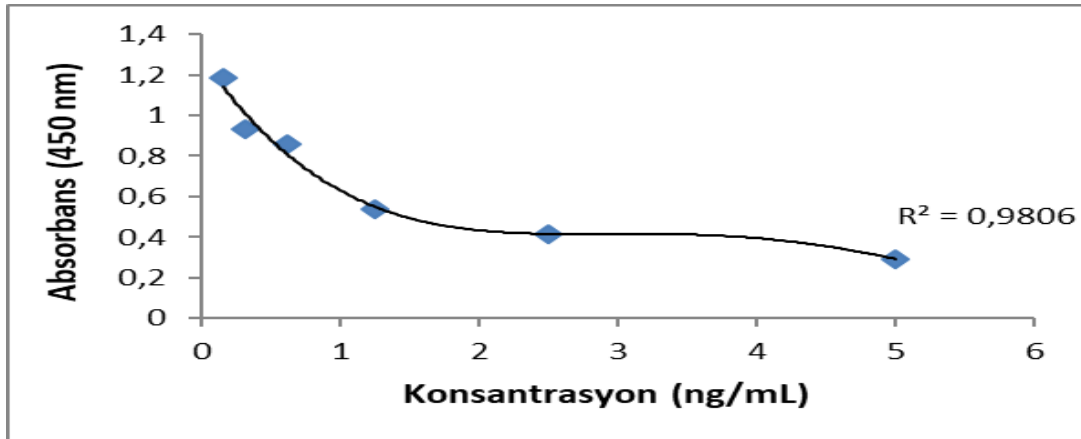
Doku ve serum örneklerinin AMH seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Elabscience, Cat No: E-EL-R0640, Wuhan, Çin) kullanılarak belirlendi. Doku sonuçları pg/mg protein birimiyle verildi. AMH ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 12’de gösterildi.



Şekil 12. AMH ölçümünde kullanılan standart grafiği

5.5.6. SOD Seviyelerinin Belirlenmesi

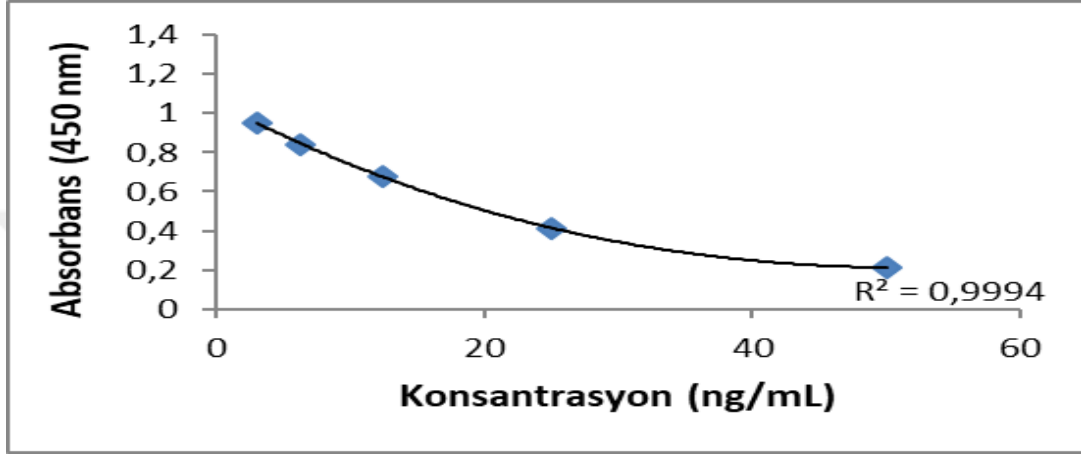
Doku örneklerinin SOD seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Elabscience, Cat No: E-EL-R1424, Wuhan, Çin) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Doku SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 13’de gösterildi.



Şekil 13. Doku SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği

5.5.7. 8-OHdG Seviyelerinin Belirlenmesi

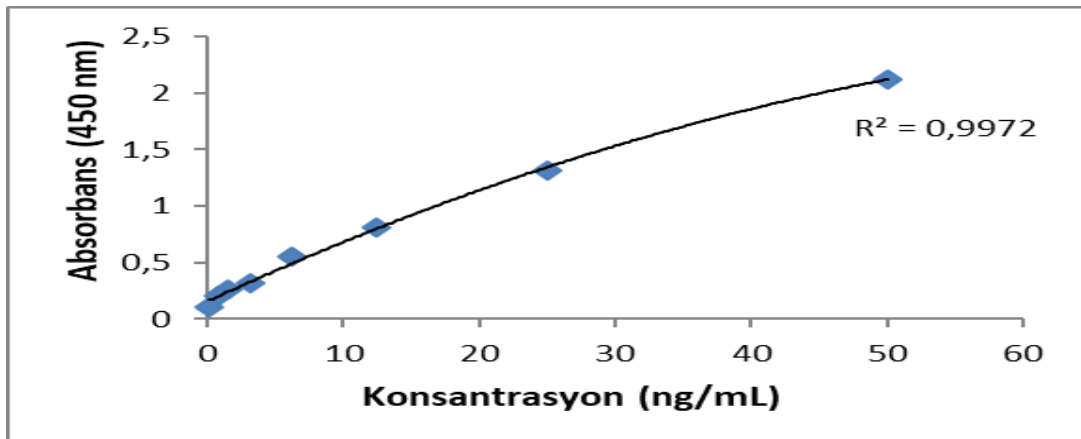
Doku örneklerinin 8-OHdG seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Elabscience, Cat No: E-EL-0028, Wuhan, Çin) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Doku 8-OHdG ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 14’de gösterildi.



Şekil 14. Doku 8-OHdG ölçümünde kullanılan standart grafiği

5.5.8. CAT Seviyelerinin Belirlenmesi

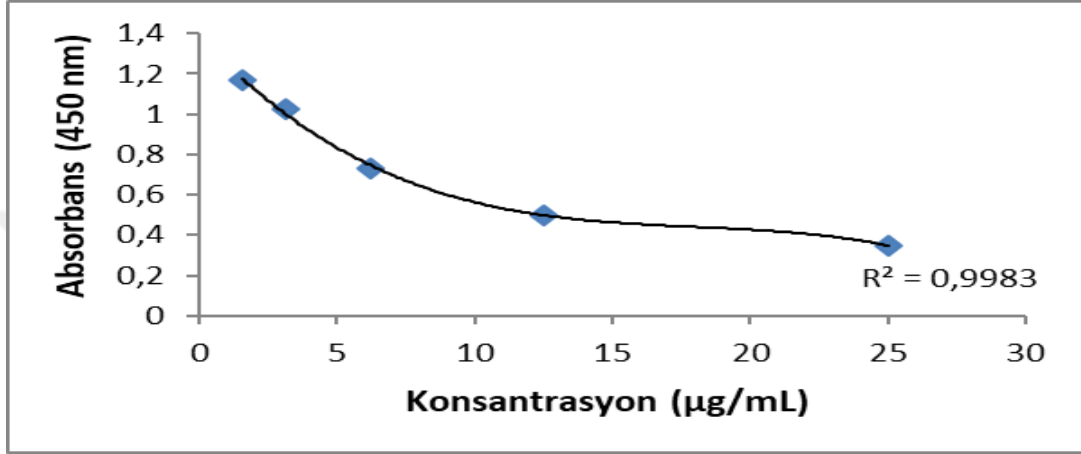
Doku örneklerinin CAT seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Cloud-Clone Corp., Cat No: SEC418Ra, Teksas, ABD) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Doku CAT ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 15’de gösterildi.



Şekil 15. Doku CAT ölçümünde kullanılan standart grafiği

5.5.9 GSH Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerinin GSH seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Elabscience, Cat No: E-EL-0026, Wuhan, Çin) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein birimiyle verildi. Doku GSH ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 16’da gösterildi.



Şekil 16. Doku GSH ölçümünde kullanılan standart grafiği

5.5.10. TOS Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki TOS seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, Cat No: RL0024, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L birimiyle verildi.

5.5.11. TAS Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki TAS seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, Cat No: RL0017, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar mmol troloks eşdeğeri/L birimiyle verildi.

5.5.12. Oksidatif Stres İndekslerinin Hesaplanması

Doku örneklerindeki OSİ ve Türkmen ve ark. (74)’larının kullandığı formüle göre hesaplandı.

$$\text{OSİ} = [\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L}]/\text{TAS, } \mu\text{mol troloks eşdeğeri/L} \times 100]$$

Histolojik değerlendirmeler için doku takibi, parafin bloklama, bloklardan kesit alınması, kesitlerin boyanması, folikül ve apoptotik hücre sayımları ve bütün histopatolojik değerlendirmeler KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı. Doku örneklerindeki biyokimyasal analizler ise KTÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı.

5.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel olarak grupların biyokimyasal analizlerinde verilerin normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uygun değerlerin istatistiksel analizleri Student-t testi kullanılarak belirlendi. Histolojik verilerinin analizlerinde değerler Kruskal Wallis varyans analizi ile karşılaştırılarak, ortalamalar ve standart deviasyonlar hesaplandı. $P<0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Karayemişin Antioksidan Kapasitesine Ait Bulgular

Tablo 4. Toplam polifenol (TP), toplam flavonoid (TF), toplam tanen (TT), FRAP ve DPPH testleri sonuçları

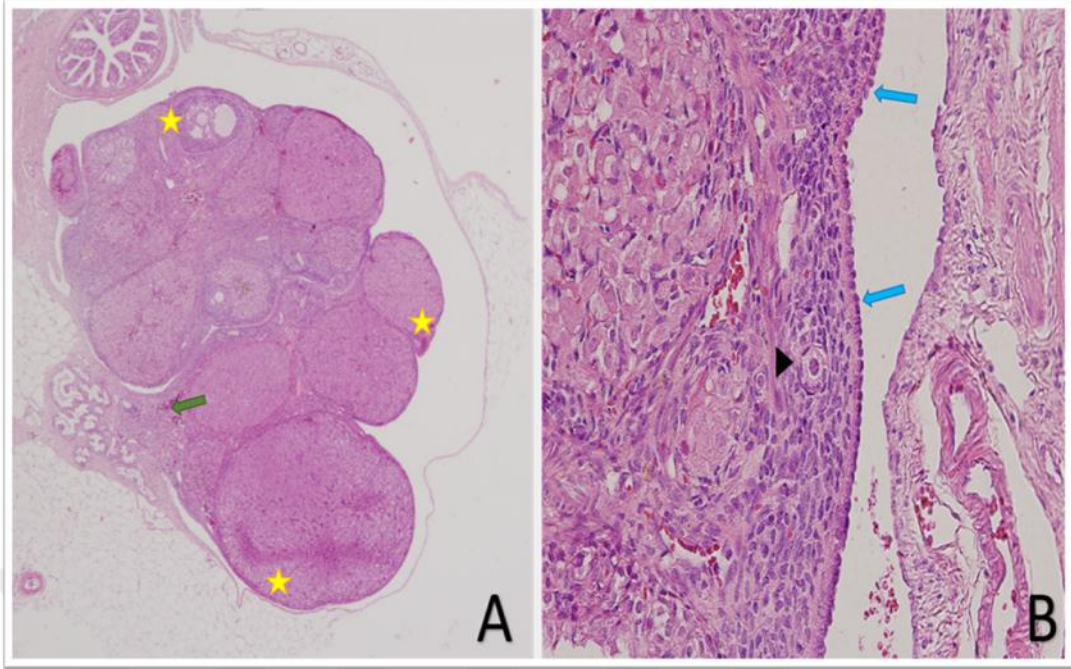
Numune	TP	TF	TT	FRAP	DPPH-SC ₅₀
Karayemiş	277.03±6.28	6.85±0.13	118.20±17.96	3001.35±14.26	2.39±0.06

Veriler, ortalama± SD olarak verildi. TP, mg GAE/100g numune; TF, mg QE/100g numune; TT, mg KE/100g numune; FRAP, µmol. L⁻¹ Troloks/100g; DPPH-SC₅₀, mg/mL

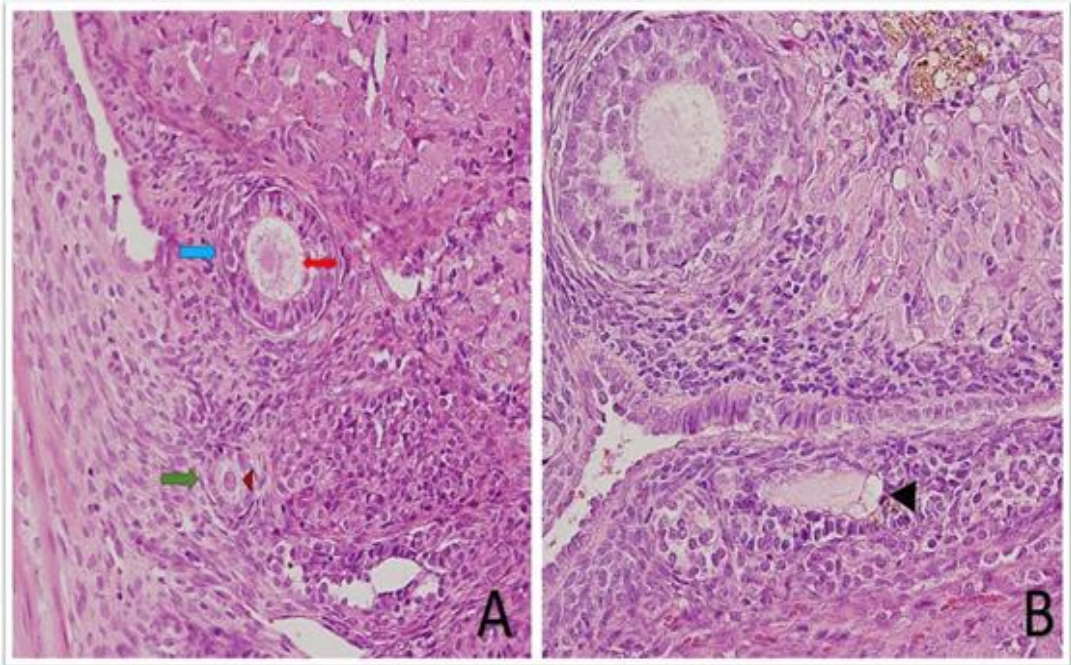
6.2. Morfolojik Bulgular

6.2.1. Folikül Sayısı

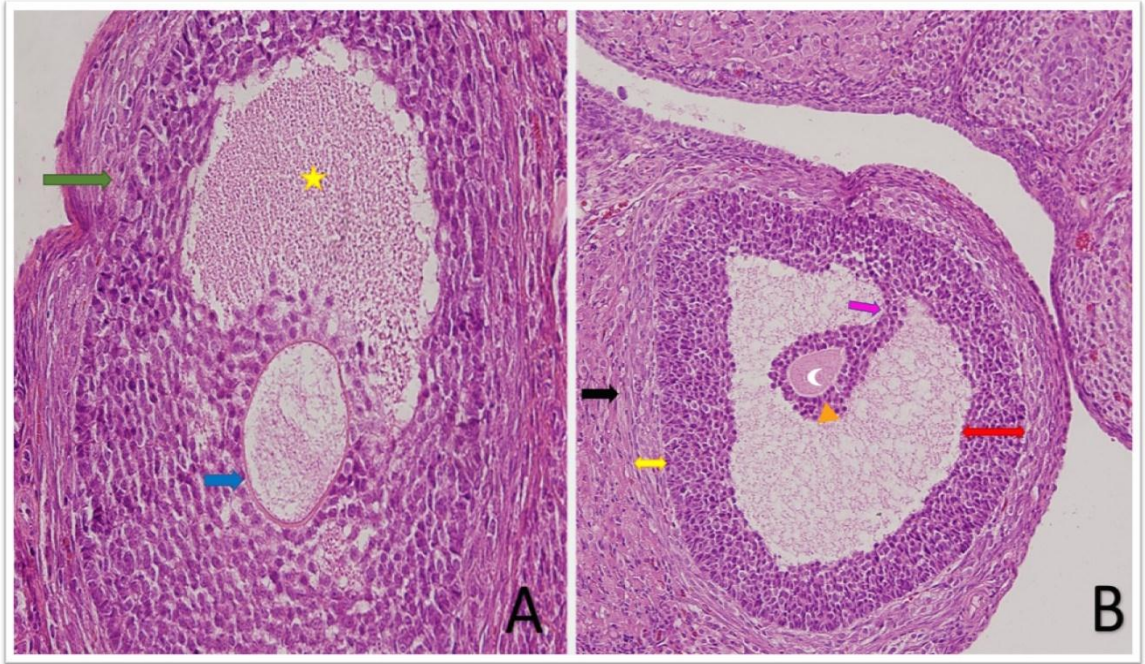
Kontrol, MTX, MTX+Karayemiş ve Karayemiş gruplarında folikül sayısı değerlendirmeleri sağ ovaryum dokularından elde edilen H&E ile boyanan kesitler üzerinde yapıldı. Yapılan sayımlar sonucunda elde edilen primordiyal folikül, primer folikül, erken primer folikül, geç primer folikül, sekonder folikül ve Graaf folikül sayıları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında Karayemiş grubundaki primordiyal folikül sayısının kontrol ve MTX grubuna göre istatistiksel olarak fazla olduğu tespit edildi (Sırasıyla P=0.009 ve P=0.009). MTX grubundaki atretik folikül sayısı da kontrol ve MTX+Karayemiş grubuna göre artmıştı (Sırasıyla P=0.002 ve P=0.002) (Resim 5,6,7; Tablo 5).



Resim 5. Sıçan ovaryumuna ait bir kesitte (A) ovaryumun medullası (yeşil ok) ve korteksi (yıldızlar) görülmektedir (H&E x 40). Diğer bir ovaryum kesitte (B) ise primordiyal folikül (ok başı) ve ovaryum yüzeyini örten germinal epitel (mavi ok) izlenmekte (H&E x 400)



Resim 6. Sıçan ovaryumunda (A) erken primer folikül (yeşil ok) içindeki primer oosit (ok başı) ve geç primer folikül (mavi ok) ve ona ait zona granüloza tabakası (kırmızı ok) görülmekte. Bir diğer kesitte (B) atretik folikül (ok başı) izlenmekte (H&E x400)



Resim 7. Sıçan ovaryumunda (A) sekonder folikül (yeşil ok), zona pellusida (mavi ok) ve antrum (yıldız) görülmekte. Bir diğer kesitte (B) ise Graaf folikülü (siyah ok), kümülüs ooforus (pembe ok), korona radiata (ok başı), oosit(ay), granüloza tabakası (kırmızı çift yönlü ok), teka tabakası (sarı çift yönlü ok) izlenmekte (H&E, x400)

Tablo 5. Folikül sayılarının gruplara göre dağılımı

	Kontrol Grubu	MTX Grubu	MTX+Karayemiş Grubu	Karayemiş Grubu
Primordiyal Folikül Sayısı	17.00±11.242	18.333±7.17	21.00±9.121	42.666±10.614 ^A
Erken Primer Folikül Sayısı	11.33±5.278	13.00±6.693	15.50±8.240	13.00±6.00
Geç Primer Folikül Sayısı	10.666±5.609	10.666±4.457	5.50±4.037	8.833±4.070
Sekonder Folikül Sayısı	44.833±22.675	46.00±4.07	61.00±37.400	54.50±12.340
Graaf Folikül Sayısı	16.33±12.452	11.166±6.968	19.666±14.207	10.833±6.968
Atretik Folikül Sayısı	7.00±3.405	38.83±20.400 ^B	10.166±7.652	17.833±10.571

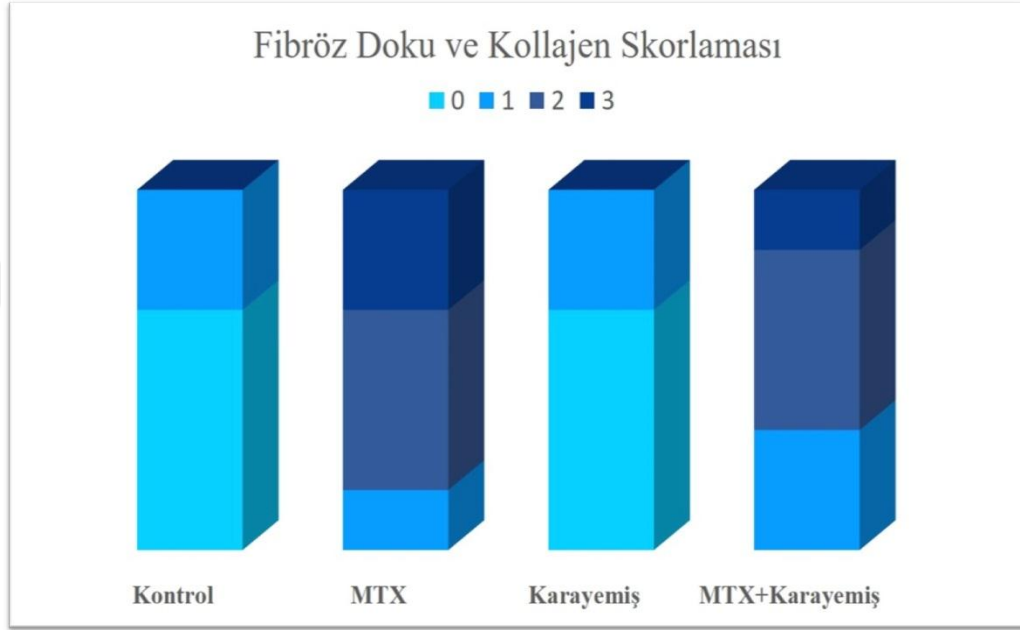
Veriler Ortalama ± SD olarak verildi. P<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

A Karayemiş grubu kontrol ve MTX gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti.

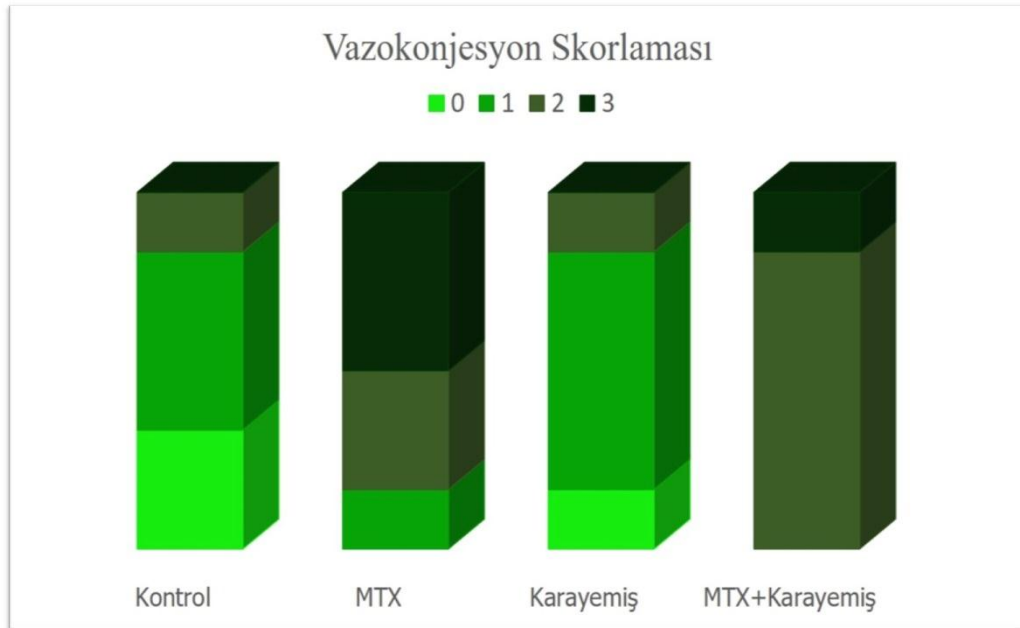
B MTX grubu, kontrol ve MTX+Karayemiş gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti.

6.2.2. Histopatolojik Değerlendirme

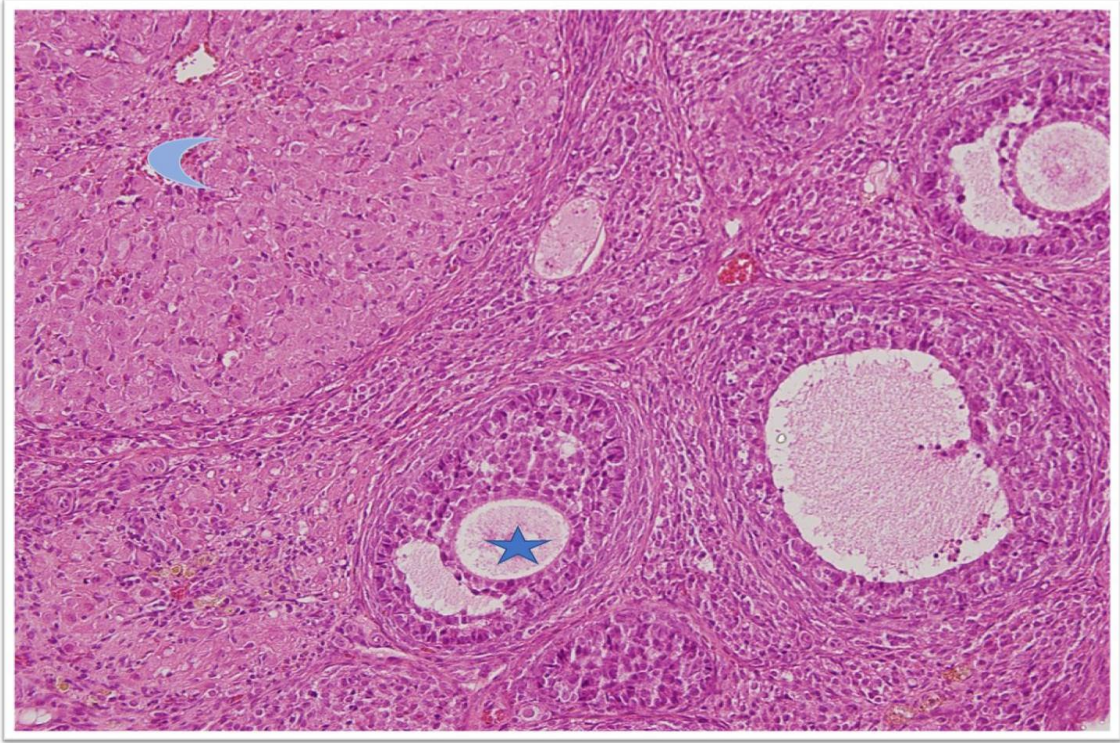
Gruplara ait sıçanların ovaryum dokularının histopatolojik değerlendirilmesinde H&E ve Masson Trikrom ile boyanmış kesitlerde fibrozis ve vazokonjesyon açısından gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 17, 18).



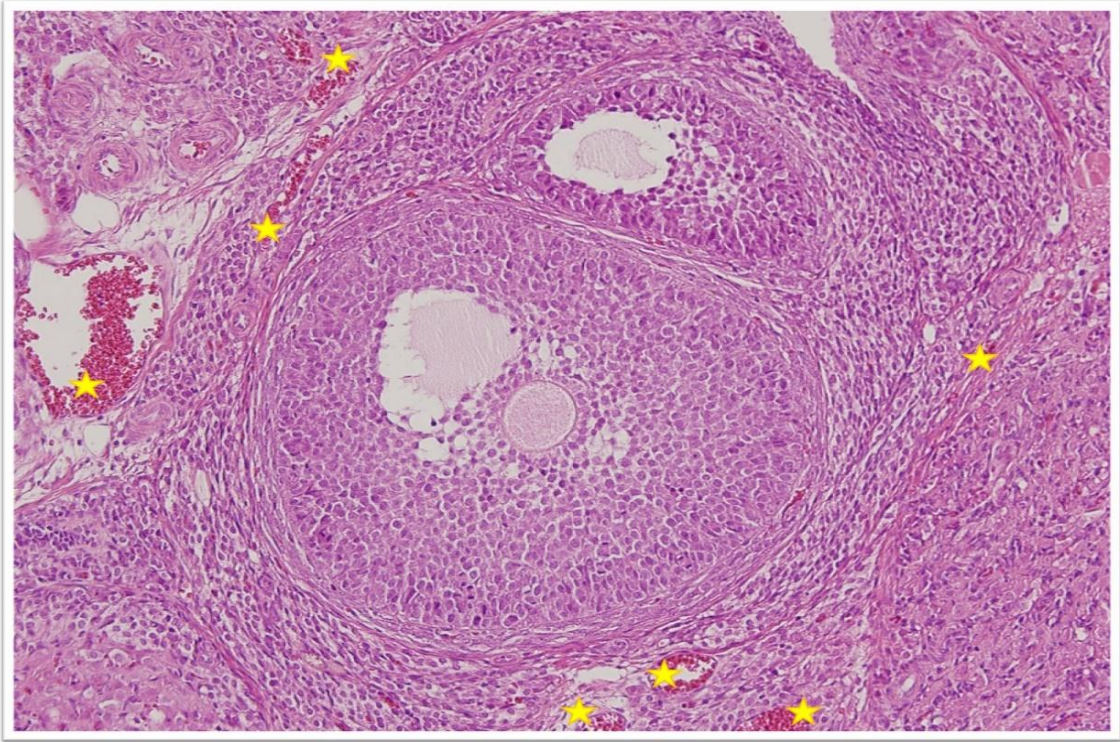
Şekil 17. Gruplara ait fibröz doku ve kollajen skorlaması



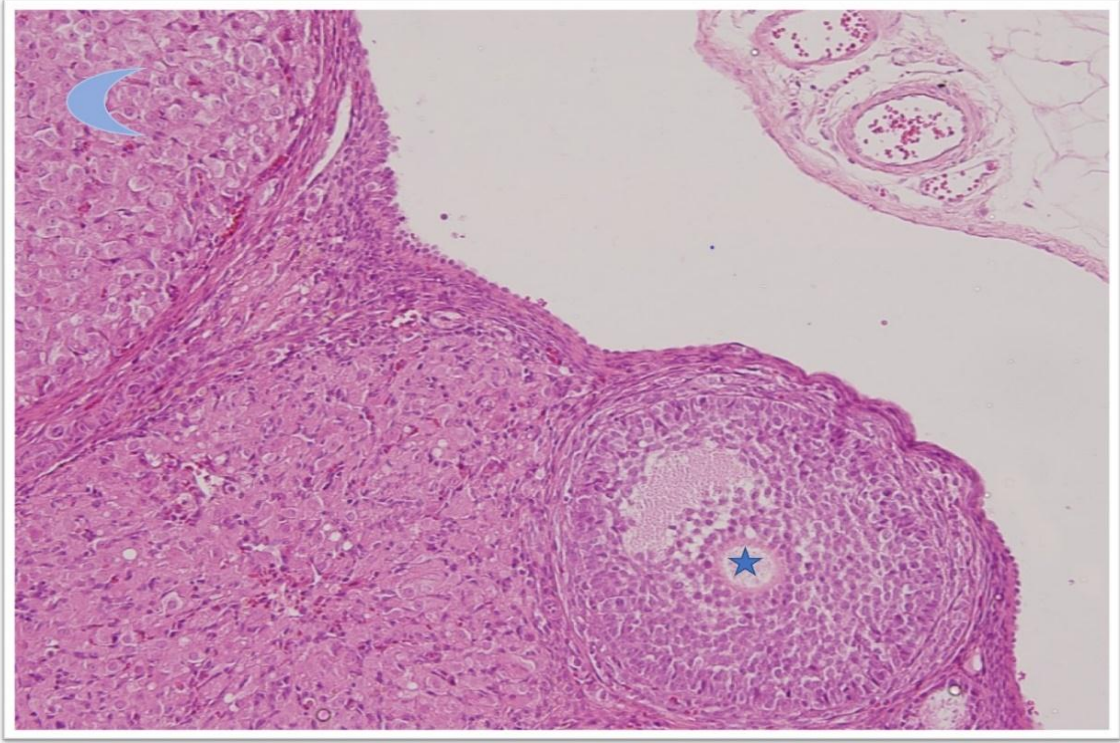
Şekil 18. Gruplara ait vazokonjesyon skorlaması



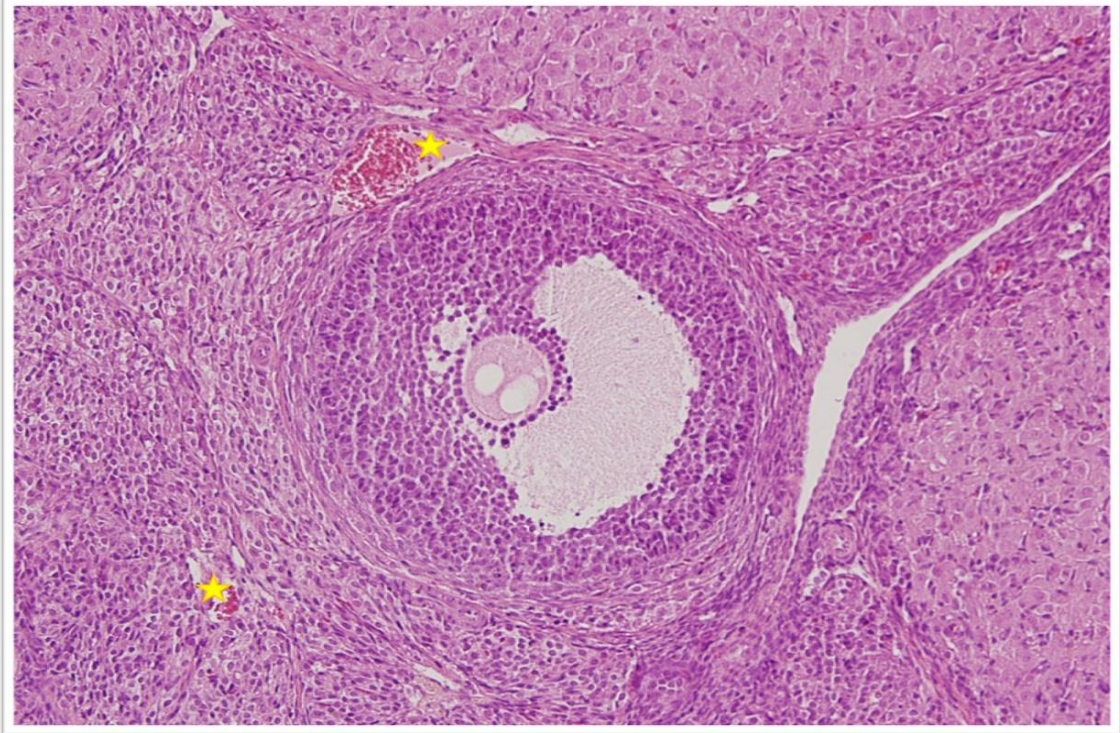
Resim 8. Kontrol grubuna ait normal ovaryum dokusunu temsil eden bir kesitte korpus luteum (ay) ve sekonder folikül içinde oosit (mavi yıldız) görülmekte (HE, X200)



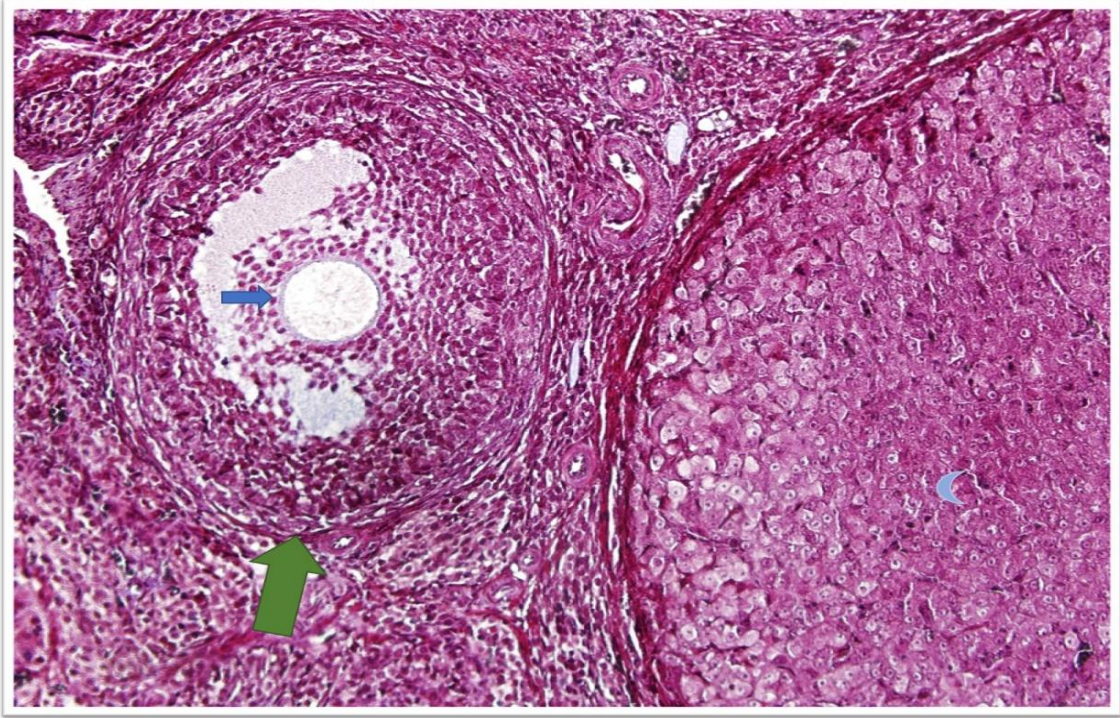
Resim 9. MTX grubuna ait bir kesitte yoğun vazokonjesyon (sarı yıldız) dikkati çekmekte (HE, X200)



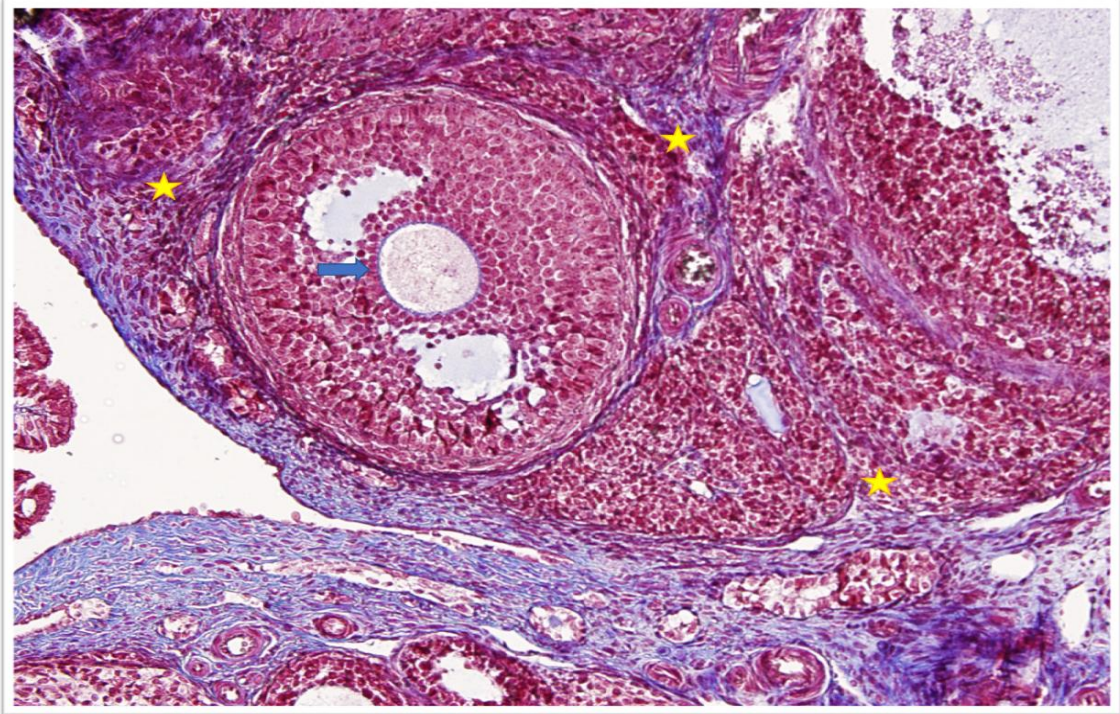
Resim 10. Karayemiş grubuna ait sağlıklı ovaryum dokusunda korpus luteum (ay) ve bir oosit (mavi yıldız) görülmekte (HE, X200)



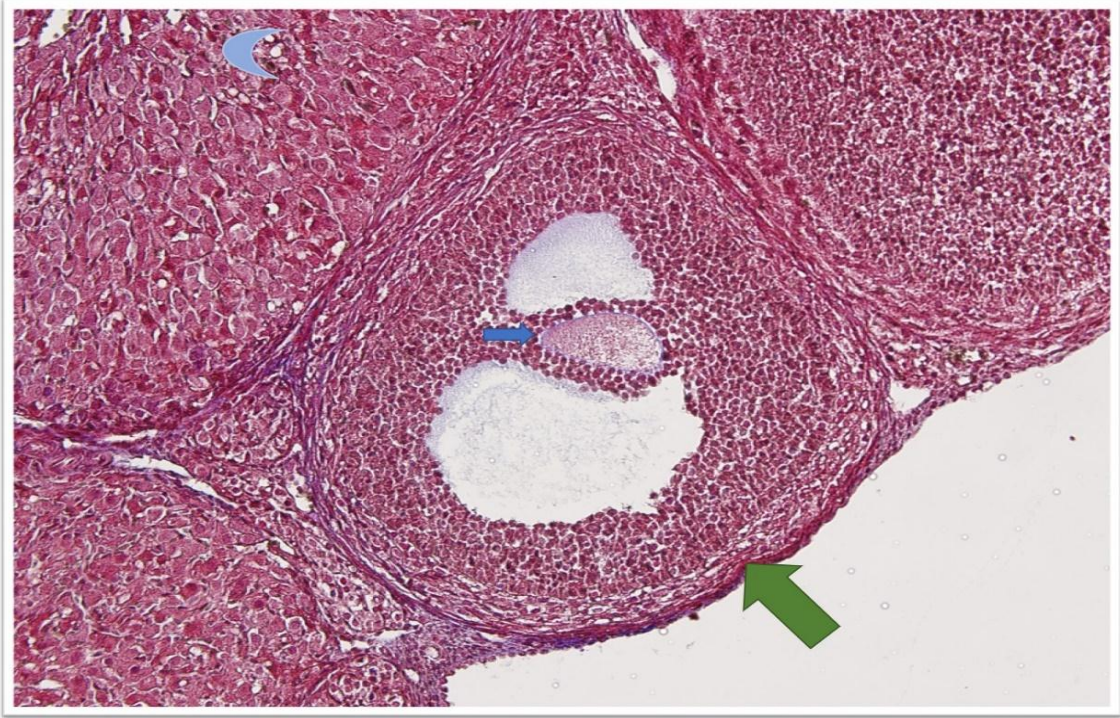
Resim 11. MTX+Karayemiş grubunda vazokonjesyonun (sarı yıldız) hafiflediği izlenmekte (HE, X200)



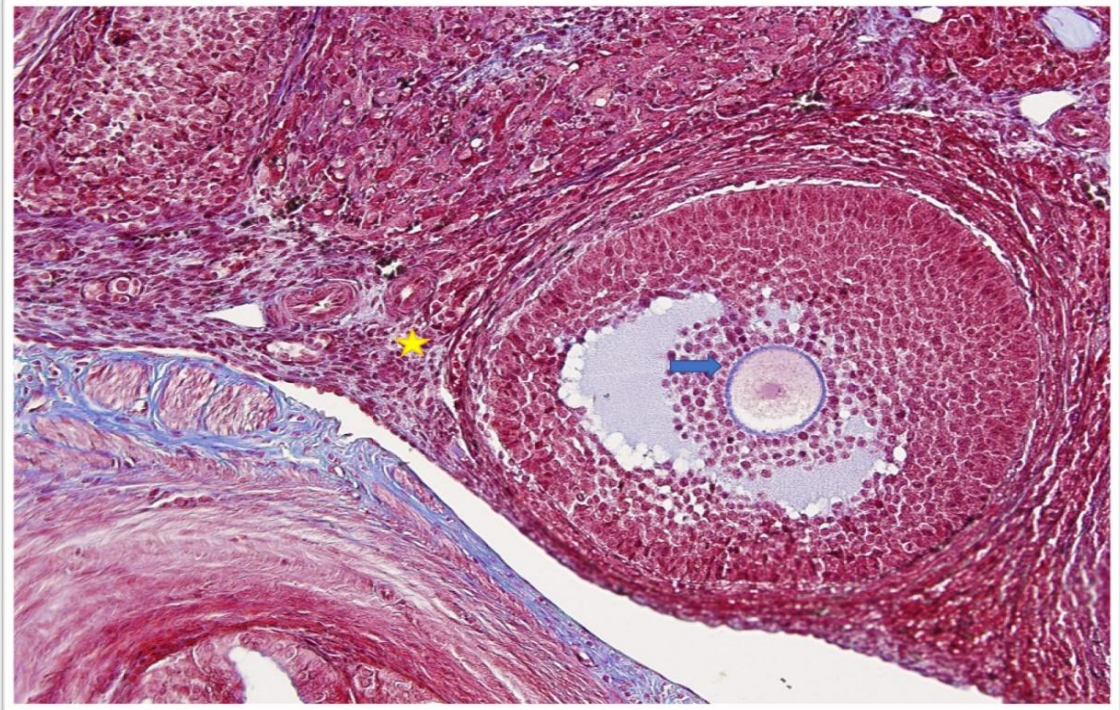
Resim 12. Kontrol grubuna ait bir kesitte folikül (yeşil ok), oositi çevreleyen zona pellusida (mavi ok) ve korpus luteum (ay) görülmekte (Masson Trikrom, x200)



Resim 13. MTX grubuna ait bir kesitte oositi çevreleyen zona pellusida (mavi ok) ve yoğun fibröz doku ve kollajen (yıldız) artışı görülmekte (Masson Trikrom, X200)



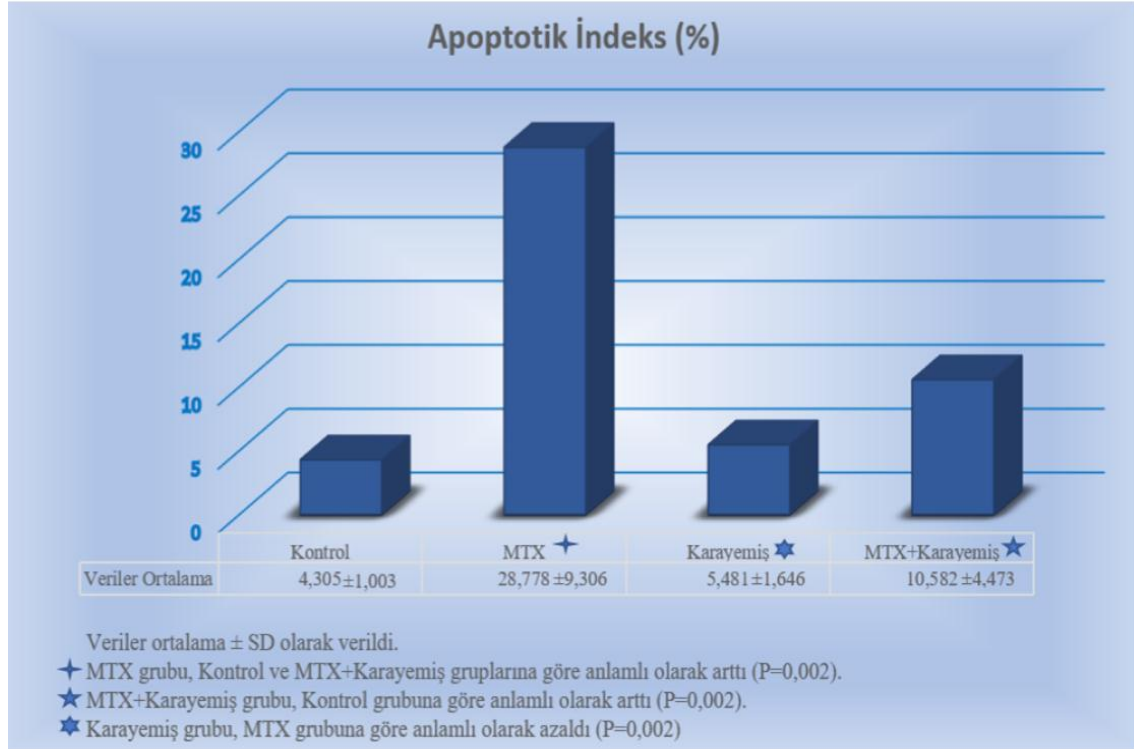
Resim 14. Karayemiş grubuna ait sekonder folikülü (yeşil ok), mavi ile boyanmış zona pellusida (mavi ok) ve korpus luteum (ay) görülmekte (Masson Trikrom, X200)



Resim 15. MTX+Karayemiş grubunda MTX grubuna göre kollajen ve fibröz doku (yıldız) artışı geriledi. Tersiyer folikül içinde mavi boyanmış zona pellusida (mavi ok) ile çevrili oosit görülmekte (Masson Trikrom, x200)

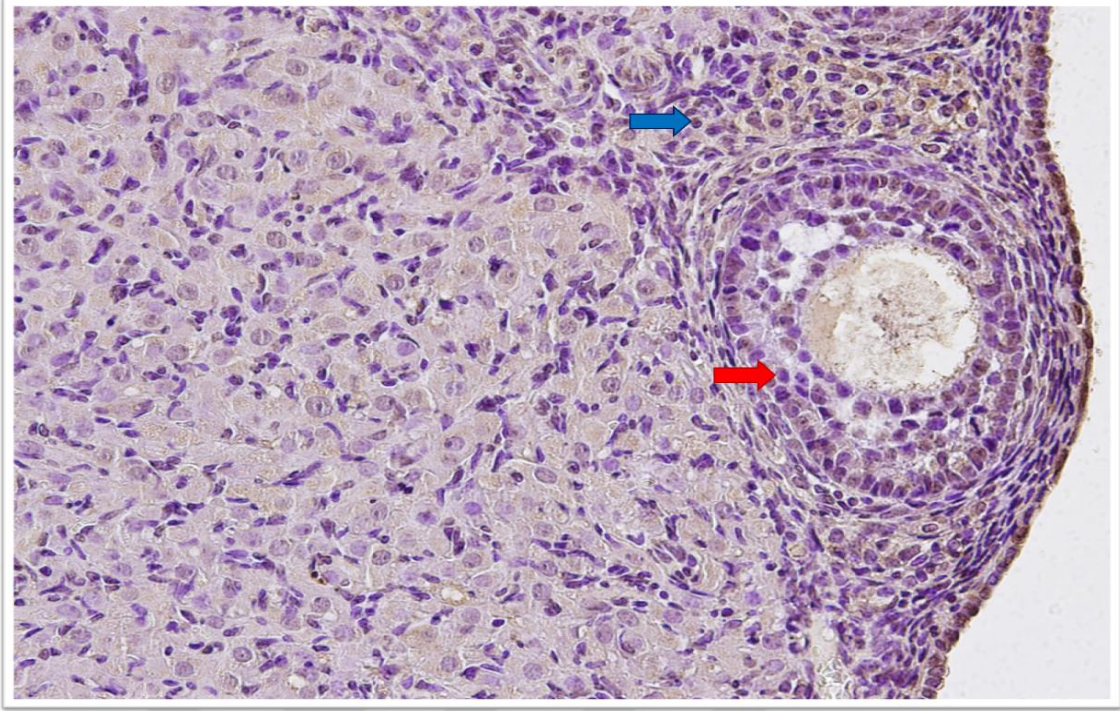
6.2.3. Apoptoz

Kontrol, MTX, MTX+Karayemiş, Karayemiş gruplarına ait sıçanların sağ ovaryum dokularından elde edilen kesitlerdeki foliküllerin granüloza hücrelerinin AI'leri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 19).

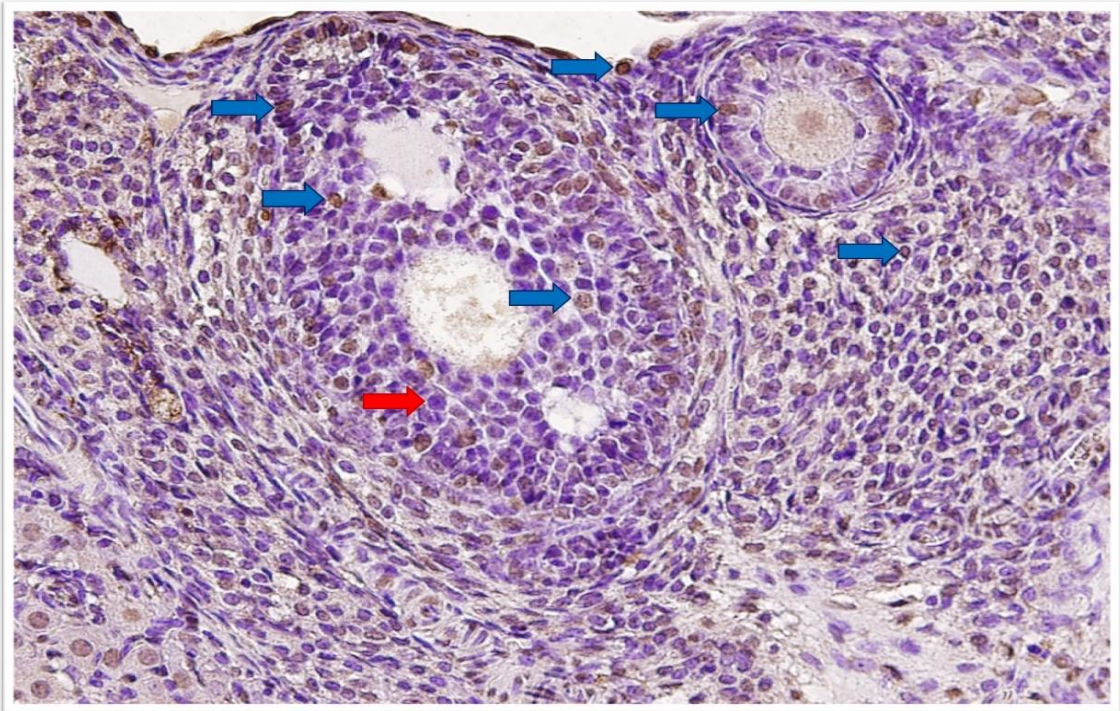


Şekil 19. AI'in gruplara göre ortalama±ortalamaların standart deviasyon değerleri ve karşılaştırılması

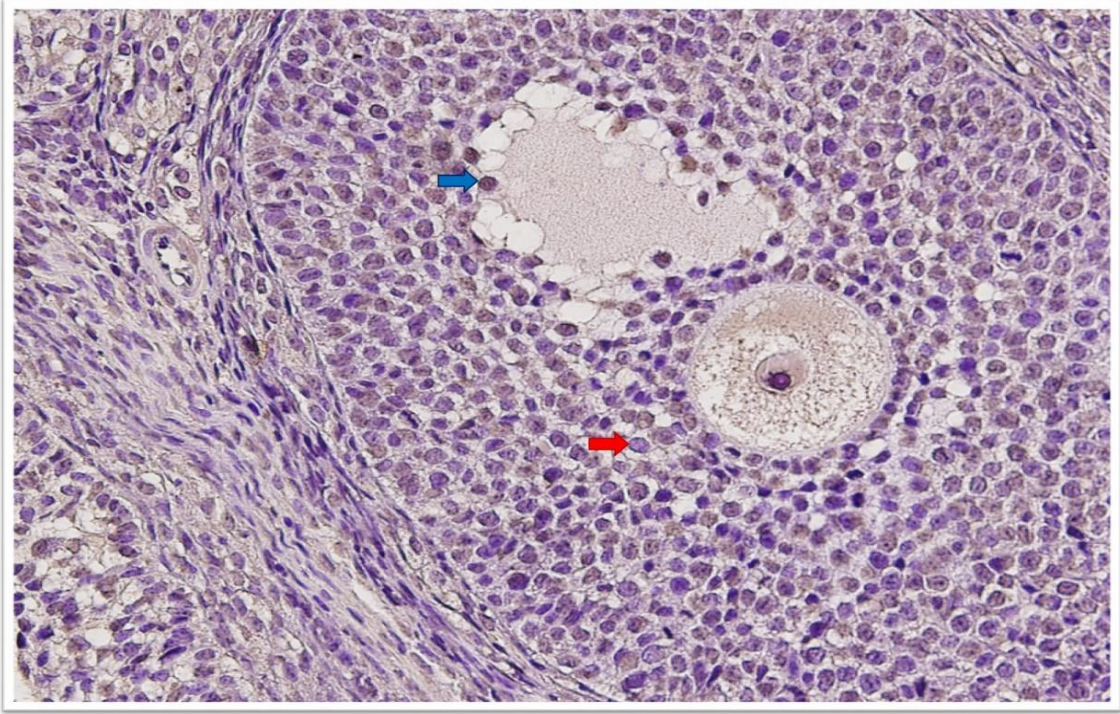
MTX grubu, Kontrol ve MTX+Karayemiş gruplarına göre; MTX+ Karayemiş grubu, kontrol grubuna göre arttı (Sırasıyla P=0.002 ve P=0.002). Karayemiş grubu ise MTX grubuna göre azaldı (P=0.002). Kontrol, MTX, MTX+Karayemiş ve Karayemiş gruplarına ait apoptotik ve normal hücreler Resim 16-19'da gösterildi.



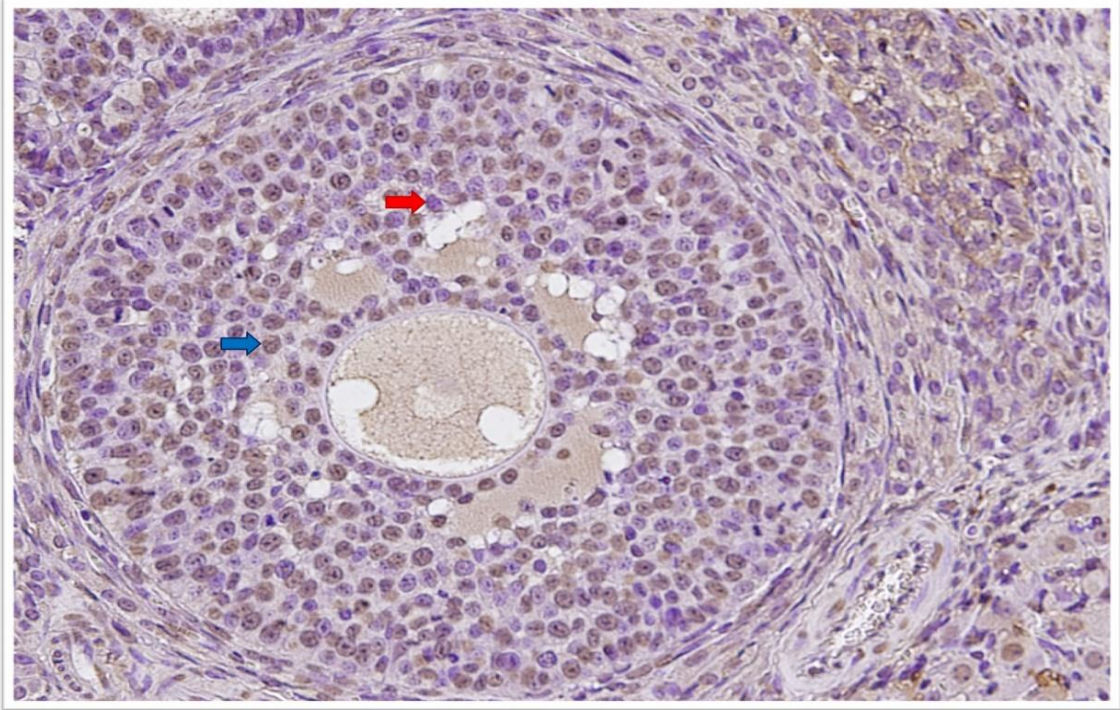
Resim 16. Kontrol grubunda, normal folikül hücresi (kırmızı ok) ve az sayıda apoptotik hücre (mavi ok) görülmekte (TUNEL x 400)



Resim 17. MTX grubunda apoptotik hücre (mavi ok) artışı ve az sayıda normal folikül hücresi (kırmızı ok) izlenmekte (TUNEL x 400)



Resim 18. Karayemiş grubunda normal folikül hücresi (kırmızı ok) ve az sayıda apoptotik hücre (mavi ok) görülmekte (TUNEL x 400)



Resim 19. MTX+Karayemiş grubunda MTX grubuna göre apoptotik hücre (mavi ok) sayısında azalma ve normal folikül hücresi (kırmızı ok) sayısında artış izlendi (TUNEL x 400)

6.3. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular

6.3.1. Doku Biyokimyası

Doku biyokimyası için sıçanların sol ovaryumları kullanıldı. MTX grubuna ait MDA, TOS, OSİ ve 8-OHdG düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak arttı (Sırasıyla; $P=0.014$, $P=0.038$, $P=0.013$, $P=0.030$). MTX grubunun CAT ve AMH düzeylerinin kontrol grubuna göre düştüğü ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (Sırasıyla; $P=0.019$, $P=0.015$). MTX+Karayemiş grubunun MDA, OSİ ve 8-OHdG düzeyleri, MTX grubuna göre istatistiksel olarak azaldı (Sırasıyla; $P=0.001$, $P=0.025$, $P=0.018$). MTX+Karayemiş grubunun CAT ve AMH düzeyleri, MTX grubuna göre istatistiksel olarak arttı (Sırasıyla; $P=0.017$, $P=0.038$) (Tablo 6).

Tablo 6. Ovaryum dokularına ait biyokimyasal parametreler

	Kontrol Grubu	MTX Grubu	MTX+Karayemiş Grubu
MDA (ng/mg protein)	27.0±6.25	39.5±8.18 ^A	22.8±2.63 ^C
TOS (μmol H ₂ O ₂ eşd/L)	4.68±0.672	6.89±2.17 ^A	5.09±1.81
OSİ	0.99±0.2003	2.01±0.788 ^A	1.07±0.378 ^C
8-OHdG (ng/mg protein)	7.66±1.19	11.1±3.13 ^A	6.01±1.01 ^C
TAS (mmol troloks eşd/L)	0.477±0.06	0.383±0.161	0.475±0.08
SOD (ng/mg protein)	0.535±0.08	0.682±0.27	0.460±0.05
CAT (ng/mg protein)	2.49±0.47	1.71±0.495 ^B	3.04±0.761 ^D
GSH (μg/mg protein)	4.6±0.7	5.9±2.5	3.8±0.7
AMH (pg/mg protein)	8.02±0.774	5.20±2.22 ^B	8.83±2.97 ^D

Veriler ortalama ± SD olarak verildi. $P<0.05$ anlamlı kabul edildi.

A MTX grubunun MDA, TOS, OSİ ve 8-OHdG değerleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttı

B MTX grubunun CAT ve AMH değerleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldı

C MTX+Karayemiş grubunun MDA, OSİ ve 8-OHdG değerleri, MTX grubuna göre istatistiksel olarak azaldı

D MTX+Karayemiş grubunun CAT ve AMH değerleri, MTX grubuna göre istatistiksel olarak arttı

7. TARTIŞMA

Kanser günümüzde ölüme sebebiyet veren hastalıkların başında gelmektedir (1). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ise yan etki olarak infertiliteye neden olabilmektedir (75).

Bu ilaçların yan etkilerini önleme veya azaltmak için lipoik asit, resveratrol ve propolis gibi (59, 76, 77) antioksidanlar denenmiştir. Biz de çalışmamızda, kanser tedavisinde sık kullanılan bir ajan olan gonadatoksik etkilere sahip MTX in sıçanlarda yol açtığı ovaryum hasarına karşı antioksidan içeriği yüksek bir meyve olan karayemişin etkilerini incelemeyi amaçladık.

MTX kullanımı, doku ve organlarda oksidatif stres kaynaklı hasarlara neden olabilir (76, 77). Oksidatif stres, oksidan/antioksidan dengesinin bozulması sonucu, dokularda aşırı ROT birikiminin neden olduğu bir durumdur. Agarwall A ve ark. (78), Erdoğan E ve ark. (79), sıçan karaciğerinde; Yuluğ E ve ark. (76), ise sıçan testisinde MTX kullanımı nedeniyle artan ROT'un membran lipidlerine zarar vermesiyle oluşan bir ürün olan MDA'nın yükseldiğini göstermişlerdir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda da çalışmamıza benzer şekilde MTX'in pek çok dokuda olduğu gibi ovaryumda da MDA artışına neden olduğu bildirilmiştir (59, 80). Çalışmamızda, MTX grubunda kontrole göre yüksek olan MDA'nın dokudaki oksidatif strese bağlı olabileceğini düşündük.

İlave olarak çalışmamızın MTX grubunda oksidatif stresin önemli göstergelerinden olan TOS ve TOS değerlerinin TAS değerlerine oranlanmasıyla hesaplanan OSI'nin literatüre benzer şekilde kontrole göre arttığı saptanmıştır (59, 81). Çalışmamızda MTX grubu ovaryum dokusunda gözlemlediğimiz MDA, TOS ve OSI artışının MTX'in oluşturduğu oksidatif stresin bir göstergesi olabileceğini düşündük.

Literatürde, birçok dokuda oksidan parametrelerde artışa yol açan MTX'in, antioksidan enzimlerde ise azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (79, 82, 83). MTX'in hasarladığı testis dokusunda resveratrolün etkilerini değerlendirdikleri çalışmada Yuluğ E ve ark. (76), MTX uygulanan grupta SOD ve CAT enzim düzeylerinin azalmış olduğunu bildirdiler. Vardı ve ark. (82)'da MTX'in sıçan karaciğerinde SOD, CAT ve Glutasyon peroksidaz (GSHPx) enzim düzeylerinin azaldığını gözlemlediler. Karapınar OS ve ark. (59) ise MTX'in ovaryumda CAT, GSHPx ve TAS seviyelerinde düşüşe

neden olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda MTX grubunda SOD, GSH ve TAS seviyeleri her ne kadar kontrole göre azalmışsa da istatistiksel fark mevcut değildi. Bunun denek sayısı veya ölçüm yöntemlerindeki farklardan kaynaklanmış olabileceğini düşündük. Kontrolle karşılaştırdığımızda literatüre benzer şekilde MTX grubu CAT seviyelerindeki istatistiksel anlamlı ve SOD, GSH, TAS seviyelerindeki istatistiksel anlamlı olmayan düşüşlerin; MTX'in antioksidan enzimler üzerindeki olumsuz etkilerine bağlı olabileceği kanaatine vardık (59, 82).

Organizmanın maruz kaldığı oksidatif stres, hücrelerde DNA hasarına neden olabilir. Artan ROT hücre lipidleri yanında hem çekirdek hem de mitokondrial DNA'ya saldırabilir. Sonuçta okside olan DNA'yı temsil eden majör biyomarkırlardan biri olan 8-OHdG oluşur. Oluşan DNA hasarı; programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozu indükleyebilir (84). Organizmada oksidatif stresi artıran MTX'de çeşitli dokularda apoptoz artışına neden olabilir (76, 85, 82). Sönmez ve ark. (77), literatürdeki çalışmalarında sıçan karaciğer hücrelerinde; Yılmaz G ve ark. (86) ise yaptıkları tez çalışmasında sıçan testisi germinal epitel hücrelerinde MTX in apoptozu artırdığını gördüler. Literatüre benzer şekilde çalışmamızda da MTX grubu folikül hücrelerinde apoptoz arttı. MTX grubunda DNA hasarını gösteren 8-OHdG düzeylerinin de artmış olması çalışmamızdaki artan programlı hücre ölümünü destekler bir bulguydu.

MTX, malign ve nonmalign çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlardan biridir ve ne yazık ki sadece hasta hücrelerde değil; sağlıklı hücrelerde de ışık mikroskopik olarak tespit edilebilen morfolojik hasara neden olmaktadır. Karaciğer ve böbrek gibi birçok hayati organ yanında; testis ve ovaryum gibi gonadal organlar da MTX'in olumsuz etkilerine maruz kalmaktadır (76, 79, 80, 81, 82). Farklı iki çalışmada MTX'in hepatositlerde vakuolizasyon, sinuzoidlerde dilatasyon ve stromada konjesyona neden olduğu gösterilmiştir (79, 82). Bir başka çalışmada MTX'in böbrekte glomeruloskleroza, inflamatuvar hücre infiltrasyonuna, tubul hücrelerinde nekroza neden olduğu bildirilmiştir (81). MTX, testiste germinal epitel hücrelerinde lümene dökülmeye, seminifer tübüllerde atrofiye yol açabilir (77, 80). İlave olarak MTX, karaciğerde ve testiste konjesyona; karaciğerde fibröz doku ve kollajen artışına neden olabilir (87, 88). Biz de çalışmamızda literatüre benzer olarak MTX grubu sıçanların ovaryumlarında vasküler konjesyon, fibröz doku ve kollajen artışı gibi histopatolojik değişiklikler gözlemledik, ancak gruplar arasında istatistiksel anlamlılık bulamadık.

Bunun nedeninin çalışma süresi, verilen MTX dozu veya çalışma grubundaki sıçan sayısından kaynaklanmış olabileceğini düşündük.

AMH tüm kadınlarda ovaryum rezervini belirlemek için kullanılabilecek güvenilir bir belirteçtir (89). Kemoterapötik ajanların ovaryum rezervi üzerine etkilerini göstermek üzere yapılan bir çalışmada dişi sıçanlarda sisplatin uygulamasının AMH ve dolayısıyla ovaryum rezervinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (90). MTX'in AMH üzerine etkilerini araştıran çalışmalarda ise doz, uygulama şekli gibi farklılıklardan kaynaklandığını düşündüğümüz çelişkili sonuçlar rapor edilmektedir. Örneğin farklı günlerde 1 mg/kg dozunda MTX uygulaması yapılan bir çalışmada MTX'in, serum AMH düzeylerinde düşmeye neden olmadığı bildirilmiştir (91).

Yine Oriol ve ark. (92) yaptıkları çalışmada MTX'in, AMH düzeylerini etkilemediğini; Uluğ ve Öner (89) ise azalttığını bildirmiştir. Biz de çalışmamızda MTX grubu ovaryum dokusunda AMH seviyelerini kontrole göre düşük bulduk. Normal şartlarda büyümekte olan folikül hücrelerinden salgılanan AMH'nın; MTX grubunda artan folikül hücre apoptozu nedeniyle düşmüş olabileceği kanaatine vardık. Çalışmamızda MTX grubunda azalan AMH değerinin Yapca ve ark. (80)'nın MTX uyguladıkları dişi sıçanlarda gözledikleri infertilite artışıyla uyumlu olduğunu gördük.

Ovaryum korteksindeki primordial follikül sayısı da ovaryum rezervini tespit etmekte kullanılan yöntemlerden biridir (93). Literatürdeki bazı çalışmalar MTX'in ovaryumda primordial foliküllerde azalmaya neden olduğunu gösterdiler (94). Ancak Uluğ ve Öner (89) ise tek doz MTX uygulamasının çalışmamıza benzer şekilde ovaryan primordial ve tersiyer folikül sayısında azalmaya yol açmadığını gördüler. Karri ve ark. (43) ise MTX uyguladıkları sıçan grubunun ovaryumlarında çalışmamıza benzer olarak atretik folikül sayısının arttığını belirlediler. Çalışmamızda MTX grubunda foliküllerin artan atreziye gidişinin de bu grupta artmış oksidatif stresin neden olduğu folikül hücrelerinin ya da immatür veya matür oositlerin apoptozu ile ilişkili olabileceğini düşündük (95).

Dokulardaki MTX kaynaklı hasarı gidermek için pek çok farklı antioksidanla yapılan çalışmalar günümüzde halen devam etmektedir (77, 79). Yuluğ ve ark. (76), sıçan testisinde resveratrolün MTX kaynaklı oksitadif stresi azaltarak doku ve serum MDA seviyelerini düşürdüğünü bildirdiler. Bir başka çalışmada ise MTX uygulanan

sıçanlara alfa lipoik asit (ALA) verilmesinin MTX grubunda artmış serum OSI değerlerinde düşüşe yol açtığı gösterildi (59).

Antioksidan tedaviler, artmış oksidatif stres ve onun ovaryum dokusunda yol açtığı olumsuz etkileri azaltmada da faydalı olabilir (95). Çok sayıda meyve gibi karayemiş meyvesi de; yapısında bulunan fenolik asit, flavonoid, antisiyanin, tanin, lignan, kateşin ve vitaminlerden özellikle askorbik asit ile yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir (12).

Karayemişte bulunan bileşiklerden olan fenolikler ve flavonoidler güçlü antioksidan etkilere sahiptirler. Bu maddeler, organizmada oluşmuş ROT'u elimine ederek, ROT oluşumunu çeşitli mekanizmalarla engelleyerek veya antioksidan enzimleri artırarak antioksidan aktivite gösterirler (96). Biz de bu çalışmada MTX+Karayemiş grubundaki MDA seviyelerinin MTX grubuna göre düşük olmasının karayemişin sahip olduğu fenolik ve flavonoidlerin antioksidan özelliklerinden kaynaklanmış olabileceğini düşündük.

Antioksidan bir enzim olan CAT düzeyi, çalışmanın MTX grubunda kontrole göre azalırken; MTX+Karayemiş grubunda MTX grubuna göre artmıştı. Bunun; sıçan böbreğinde MTX hasarına karşı antioksidan olarak CAPE uygulanan çalışmadakine benzer şekilde karayemişin de antioksidan etkisiyle MTX'in CAT üzerindeki negatif etkilerini gidererek CAT seviyelerini düzeltmesinden kaynaklanmış olabileceğini düşündük (97). İlave olarak yeşil çayda bulunan kateşinlerin endojen SOD ve CAT'ı artırdıkları gösterilmiştir (98). Bu da bize çalışmamızın MTX+Karayemiş grubunda gözlenen CAT seviyelerinin artışının karayemişteki kateşinlere de bağlanabileceğini düşündürdü.

MTX+Karayemiş grubunda OSI değerinin MTX'e göre anlamlı düşük olması; bu grupta karayemişin içeriğindeki fenolikler, flavonoidler ve kateşinlerin yardımıyla ROT etkilerini bloke ederek veya CAT'ı ve bizim ölçemediğimiz endojen antioksidanları artırarak oksidatif stresi kompanse etmiş olabileceği fikrini destekledi.

MTX+Karayemiş grubunda hem 8-OHdG seviyeleri hem de apoptotik indeks MTX grubuna göre düşüktü. Bu veriler literatürde testis ve karaciğer gibi dokularda MTX'e karşı farklı antioksidanların kullanıldığı çalışmalara benzerdi (76, 82, 99). İlave olarak MTX+Karayemiş grubunda AI MTX'e göre düşükken; kontrole göre yüksekti.

Bu da MTX'in foliküler hücrelerde oksidatif stres kaynaklı apoptozu indüklediğini; karayemişin ise bu etkiyi gidermede başarılı olabileceğini gösterdi.

Karayemiş; oldukça yüksek askorbik asit seviyelerine sahiptir (65). Askorbik asit foliküllerde oksidatif stress kaynaklı apoptozu azaltmaktadır (100). Bu nedenle karayemişteki yüksek askorbik asit içeriğinin de çalışmamızda, MTX+Karayemiş grubu apoptotik indexinin MTX grubuna göre düşük olmasına katkı sağladığı düşünülebilir. Atretik folikül sayısının MTX+Karayemiş grubunda MTX grubuna göre düşük olması da karayemişin folikül hücrelerindeki iyileştirici etkisine ikincil olarak foliküllerdeki atreziiyi azaltmış olabileceğini akla getirdi. Ovaryumda ROT ve antioksidanlar arasında kompleks bir ilişki vardır. Oosit matürasyonu sırasında diploten evresinde beklemekte olan oositler için minimal ROT artışı bile mayozun devamına neden olabilir. (78).

Çalışmamızda karayemiş grubunda MTX grubuna ve şaşırtıcı şekilde kontrol grubuna göre primordial folikül sayısında yükseklik tespit ettik. Kontrol grubuna göre primordial folikül sayısının yüksek olması karayemişin oksidan-antioksidan dengesinde değişikliğe neden olmasıyla ilişkilendirilebilir. Karayemişin dokudaki antioksidan etkisiyle bazı foliküllerin primordial folikül evresinden çıkışlarını engellemiş olabileceğini düşündük.

Sonuç olarak çalışma verilerimizden yola çıkarak, MTX'in sıçan ovaryum dokusunda biyokimyasal ve histolojik olarak gösterilebilen oksidatif stres kaynaklı hasara neden olduğunu ve oral olarak uygulanan karayemiş meyve ekstratının bu hasarı azalttığını söyleyebiliriz.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Deneysel olarak erişkin dişi sıçanlarda tek doz i.p. MTX uygulamasına karşı 5 gün oral karayemiş ektraktı tedavisinin ovaryum dokusundaki etkilerini araştırdığımız çalışmamızda;

1. MTX'in dişi sıçan ovaryum dokusunda biyokimyasal olarak MDA, 8-OHdG, TOS ve OSİ seviyelerinde artışa ve CAT seviyelerinde azalmayla temsil edilen oksidatif strese neden olduğu belirlendi.
2. MTX'in ovaryum dokusu AMH seviyelerinde azalmaya yol açtığı yani ovaryum rezervini olumsuz etkilediği belirlendi.
3. MTX'in neden olduğu oksidatif stresin ovaryumda foliküler hücrelerde apoptoz artışına neden olduğu görüldü.
4. MTX'in atretik folikül sayısında artışa neden olduğu tespit edildi.
5. Karayemiş takviyesinin ovarian doku MDA, 8-OHdG ve OSİ seviyelerinde azalmaya, CAT seviyesinde artışa neden olduğu; yani MTX kaynaklı oksidatif stresi azalttığı görüldü.
6. Karayemiş takviyesinin MTX'in foliküler hücre apoptozunu azalttığı belirlendi.
7. Karayemiş takviyesinin MTX'in indüklediği foliküler atreziyi azalttığı tespit edildi.
8. Karayemiş takviyesinin MTX'in dokuda düşmesine neden olduğu ovaryum rezerv belirteci olan AMH seviyelerini normal düzeylere getirdiğini yani MTX'in ovaryum rezervi üzerine olumsuz etkilerini giderdiği tespit edildi.

Çalışmamızın bize sunduğu veriler doğrultusunda yapılacak sonraki çalışmalarda;

1. Karayemişin ovaryum üzerindeki yararlı etkilerinin hangi maddelerce oluşturulduğunun net olarak belirleyebilmek için madde içerikleriyle farklı doz ve uygulama şekilleri kullanılabilir.
2. Oksidan ve antioksidan parametreler üzerindeki etkilerinin anlaşılması için gen düzeyinde çalışmalar yapılabilir.

3. Çalışmamızın eksik yönü olan elektron mikroskopik inceleme çalışmalara dahil edilebilir.
4. Antiapoptotik etkileri ve foliküler atreziyi önlemedeki etkileri moleküler düzeyde araştırılabilir.



9. KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in Globocan 2012. *International Journal of Cancer* 136: 359-386.
2. Matthews SB, Thompson J (2016). The obesity-breast cancer conundrum: An analysis of the issues. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 989.
3. Widemann BC, Adamson PC (2006). Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *The Oncologist* 11: 694-703.
4. Abolmaali SS, Tamaddon AM, Dinarvand R (2013). A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 71: 1115-1130.
5. Armagan A, Uzar E, Uz E, Yilmaz HR, Kutluhan S, Koyuncuoglu HR, Soyupek S, Cam H, Serel TA (2008). Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Human & Experimental Toxicology* 27: 547-552.
6. Babiak RMV, Campello AP, Carnieri EGS, Oliveira MABM (1998). Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochemistry and Function* 16: 283-293.
7. Ayaz FA, Reunanen M, Küçükislamoğlu M, Var M (1995). Seed fatty acid composition in wild form and cultivars of *Laurocerasus officinalis* Roem.. *Pakistan Journal of Botany* 27: 305-308.
8. Yeşilada E, Sezik E, Honda G, Takaishi Y, Takeda Y, Tanaka T (1999). Traditional medicine in Turkey IX: Folk medicine in north-west Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology* 64: 195-210.
9. Ayaz FA (1997). Studies on water soluble sugar and sugar alcohol in cultivar and wild forms of *Laurocerasus officinalis* Roem.. *Pakistan Journal of Botany* 29: 331-336.

10. Erdemoglu N, Küpeli E, Yeşilada E (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 89: 123-129.
11. Akkol Küpeli E, Kırmızıbekmez H, Kucukboyacı N, Goren CA, Yesilada E (2012). Isolation of active constituents from cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) leaves through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology* 139: 527-532.
12. Kolayli S, Küçük M, Duran C, Dinçer B, Candan F (2003). Chemical and antioxidant properties of *Laurocerasus officinalis* roem. (cherry laurel) fruit grown in the Black Sea Region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7489-7494.
13. Kawashima I, Kawamura K (2017). Disorganization of the germ cell pool leads to primary ovarian insufficiency. *Reproduction* 153: 205–213.
14. Agneta B, Natalia D, Yinzhi Y, Ram SM (2003). Dynamics of ovarian development in the FORKO immature mouse: structural and functional implications for ovarian reserve. *Biology of Reproduction* 69: 1281–1293.
15. Avila J, González-Fernández R, Rotoli D, Hernández J, Palumbo A (2016). Oxidative stress in granulosa-lutein cells from in vitro fertilization patients. *Reproductive Sciences* 23: 1656–1661.
16. Gartner LP, Hiatt JL (2000). *Color Atlas of Histology*, Üçüncü Baskı Baltimore, Lippincott Williams& Wilkins, 342.
17. Scanlon VC, Senders T (2007). *Essentials of Anatomy and Physiology*. Beşinci Baskı, FA Davis Company, 462-464.
18. Saladin KS (2008). *Human Anatomy*. İkinci Baskı, The McGraw-Hill Companies, 749-750.
19. Ramírez-González JA, Vaamonde Lemos R, Cunha-Filho JS, Varghese AC, Swanson RJ (2016). Exercise and human reproduction: Overview of the female reproductive system, Springer Science Business Media New York, 19-46.

20. Sadler TW (2012). Langman's Medical Embryology, Onikinci Baskı, Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer, 243-245.
21. Hannah P (1969). The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinologica* 62: 98-116.
22. Ross MH, Pawlina W (2011). Histology a Text and Atlas, Altıncı Baskı. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
23. Lamming GE (1994). Marshall's Physiology of Reproduction: Pregnancy and Lactation, Dördüncü Baskı 3: 14.
24. Singh I (2010). Textbook of Human Histology (With Colour Atlas & Practical Guide), Altıncı Baskı, Jaypee Brothers Medical Publishers 304-308.
25. Junqueira LC, Carneiro J (2003). Basic Histology, Onuncu Baskı 449-453.
26. Gougeon A (1996). Regulation of ovarian follicular development in Primates: facts and hypothesis. *Endocrine* 2: 121-147.
27. Krause WJ (2005). Krause's Essential Human Histology for Medical Students, Üçüncü Baskı, 239-243.
28. Kuehnel W (2003). Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy, Dördüncü Baskı, Revised and Enlarged, Georg Thieme Verlag 400-404.
29. Ovale KW, Nahirney PC (2009). Netter Temel Histoloji, Güneş Tıp Kitapevi, 399-409.
30. Eroschenko VP (2013). diFiore'nin Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle, Onikinci Baskı, Palme Yayıncılık 505-533.
31. Shembekar CA, Upadhye JJ, Shembekar MC, Welekar SH (2017). Anti-mullerian hormone (AMH) as predictor of ovarian reserve. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology* 6(9): 4006-4010.
32. Visser JA, de Jong FH, Laven1 JSE, Themmen APN (2006). Anti-mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction and Fertility* 131: 1-9.
33. McGee EA, Hsueh AJ (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews* 21: 200-214.

34. Durlinger ALL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegeod JA, Themmen APN (2001). Anti-mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142: 4891–4899.
35. Visser JA, Themmen APN (2005). Anti-mullerian hormone and folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 234: 81–86.
36. Hashkes PJ, Becker ML, Cabral DA, Laxer RM, Paller AS, Rabinovich CE, Turner D, Zulian F (2013). Methotrexate: New uses for an old drug. *The Journal of Pediatrics* 164(2): 231-236.
37. El-Sheikh Azza AK, Morsy Mohamed A, Al-Taher Abdulla Y (2014). Multi-drug resistance protein (Mrp) 3 may be involved in resveratrol protection against methotrexate-induced testicular damage. *Life Sciences* 119: 40-46.
38. Chiang HM, Fang SH, Wen KC, Hsiu SL, Tsai SY, Hou YC, Chi YC, Chao PD (2005). Life-threatening interaction between the root extract of *Pueraria lobata* and methotrexate in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 209: 263–268.
39. Uzar E, Koyuncuoglu HR, Uz E, Yilmaz HR, Kutluhan S, Kilbas S, Gultekin F (2006). The activities of antioxidant enzymes and the level of malondialdehyde in cerebellum of rats subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Molecular and Cellular Biochemistry* 291: 63–68.
40. Lima A, Sousa H, Monteiro J, Azevedo R, Medeiros R, Seabra V (2014). Genetic polymorphisms in low-dose methotrexate transporters: current relevance as methotrexate therapeutic outcome biomarkers. *Pharmacogenomics* 15 (12): 1611-1635.
41. Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR (2013). Kelley's and Firestein's Textbook of Rheumatology, Dokuzuncu Baskı Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 917.
42. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P., Jena GB (2009). Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: intervention of folic and folinic acid. *Mutation Research* 673 (1): 43-52.

43. Karri S, Vanithakumari G (2011). Effect of methotrexate and leucovorin on female reproductive tract of albino rats. *Cell Biochemistry and Function* 29: 1–21.
44. Kivity S, Zafir Y, Loebstein R, Pauzner R, Mouallem M, Mayan H (2014). Clinical characteristics and risk factors for low dose methotrexate toxicity: a cohort of 28 patients. *Autoimmunity Reviews* 13: 1109–1113.
45. Caron JE, Krull KR, Hockenberry M, Jain N, Kaemingk K, Moore IM (2009). Oxidative stress and executive function in children receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood and Cancer* 53(4): 551-556.
46. Kopani M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biro C (2006). Oxidative stress and electron spin resonance. *Clinica Chimica Acta* 364: 61-66.
47. Tiwari AK (2004). Antioxidants: New generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Current Science* 86(8): 1092-1102.
48. Velavan S (2011). Free radicals in health and diseases. *Pharmacologyonline* 1: 1062- 1077.
49. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huyc C (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* 4(2): 89-96.
50. Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India* 52: 794-804.
51. Birben E, Şahiner ÜM, Saçkesen C, Erzurum S, Kalaycı Ö (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal* 5: 9-19.
52. Sisein EA (2014). Biochemistry of free radicals and antioxidants. *Scholars Academic Journal of Biosciences* 2(2): 110-118.
53. Mayne ST (2003). Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *American Society for Nutritional Sciences* 133: 933–940.
54. Durackova Z (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research* 59: 459-469.

55. Yadav A, Kumari R, Yadav A, Mishra JP, Srivastava S, Prabha S (2016). Antioxidants and its functions in human body-a review. *Research In Environment and Life Sciences* 9: 1328-1331.
56. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Choudhary AK, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK, Pakuwal U (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15: 4405-4409.
57. Erel O (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry* 37: 112-119.
58. Erel O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry* 38: 1103-1111.
59. Soylu Karapınar O, Pınar N, Özcan O, Özgür T, Dolapcoğlu K (2017). Protective effect of alpha-lipoic acid in methotrexate-induced ovarian oxidative injury and decreased ovarian reserve in rats. *Gynecological Endocrinology* 33(8): 653-659.
60. Hricova A, Fejer J, Libiakova G, Szabova M, Gazo J, Gajdosova A (2016). Characterization of phenotypic and nutritional properties of valuable *Amaranthus cruentus* L. Mutants. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 40: 761–771.
61. Temiz H, Tarakçı Z (2017). Composition of volatile aromatic compounds and minerals of tarhana enriched with cherry laurel (*Laurocerasus officinalis*). *Journal of Food Science and Technology* 54(3): 735–742.
62. Krsrbegovic IT, Stojicevic SS, Velickovic DT, Todorovic ZB, Nikolic NC, Lazic ML (2014). The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. *Industrial Crops and Products* 54: 142-148.
63. Orhan IE, Akkol EK (2011). Estimation of neuroprotective effects of *Laurocerasus officinalis* Roem. (cherry laurel) by in vitro methods. *Food Research International* 44: 818-822.
64. Sulusoğlu M (2011). The cherry laurel (*Prunus laurocerasus* L.) tree selection. *African Journal of Agricultural Research* 6(15): 3574-3582.

65. Karataş E, Uçar A (2018). Evaluation The effect of cherry laurel (*Laurocerasus Officinalis*) on health. Journal of Health Sciences 27: 70-75.
66. Liyana-Pathirana CM, Shahidi F, Alasalvar C (2006). Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus officinalis* Roem.) and its concentrated juice. Food Chemistry 99: 121–128.
67. Singleton VL, Rossi JA (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158.
68. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 299: 152-178.
69. Fukumoto LR, Mazza G (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(8): 3597-3604.
70. Prior RL, Wu X, Schaic K (2005). Standardized methods for the tetermination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(10): 4290-4302.
71. Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from fagraea blumei. Medicinal and Biological Chemistry 80(4): 1144-1152.
72. Can Z, Yildiz O, Sahin H, Turumtay EA, Silici S, Kolayli S (2015). An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties. antioxidant capacities and phenolic profiles. Food Chemistry 180: 133-141.
73. De Villiers A, Lynen F. Crouch A, Sandra P (2004). Development of a solid-phase extraction procedure for the simultaneous determination of polyphenols organic acids and sugars in wine. Chromatographia 59: 403-409.
74. Turkmen S, Mentese S, Mentese A, Sumer AU, Saglam K, Yulug E, Turedi S, Gunduz A (2013). The value of signal peptide-CUB-EGF domain-containing protein 1 and oxidative stress parameters in the diagnosis of acute mesenteric ischemiai. Academic Emergency Medicine 20: 257-264.

75. Gradishar WJ, Schilsky RL (1988). Effects of cancer treatment on the reproductive system. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 8(2): 153-171.
76. Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Türedi S, Kahraman C (2013). Effects of resveratrol on methotrexate-induced testicular damage in rats. *The Scientific World Journal* 1-6.
77. Sönmez MF, Çilenk KT, Karabulut D, Ünalmiş S, Deligönül E, Öztürk I, Kaymak E (2016). Protective effects of propolis on methotrexate-induced testis injury in rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 79: 44-51.
78. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 10: 49.
79. Erdogan E, Ilgaz Y, Gurgor PN, Oztas Y, Topal T, Oztas E (2015). Rutin ameliorates methotrexate induced hepatic injury in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira* 30(11): 779.
80. Yapca ÖE, Börekci B, Turan MI, Gulapoglu M (2014). The effect of agomelatine on oxidative stress induced with ischemia/reperfusion in rat ovaries. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 23(5): 715–721.
81. Asci H, Ozmen O, Ellidag HY, Aydin B, Bas E, Yilmaz N (2017). The impact of gallic acid on the methotrexate-induced kidney damage in rats. *Journal of Food and Drug Analysis* 25: 890-897.
82. Vardı N, Parlakpınar H, Cetin A, Erdogan A, Ozturk C (2010). Protective effect of α -carotene on methotrexate– induced oxidative liver damage. *Journal of Toxicologic Pathology* 38(4): 592-597.
83. Kahraman H, Kurutaş E, Tokur M, Bozkurt S, Çıralık H, Kabakcı B, Köksal N, Balkan V (2013). Protective effects of erythropoietin and N-acetylcysteine on methotrexate-induced lung injury in rats. *Balkan Medical Journal* 30: 99-104.
84. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J(2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84.

85. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB (2008), Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice. *Mutation Research* 655: 59-67.
86. Yılmaz G (2014). Sıçanlarda methotrexate kaynaklı testis hasarına karşı *Laurocerasus Officinalis* Roem. (Karayemiş)'in antiapoptotik ve antioksidan etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
87. Tag HM (2015). Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15: 252.
88. Yüncü M, Bükücü N, Bayat N, Sencar L, Tarakçıoğlu M (2015). The effect of vitamin E and L-carnitine against methotrexate-induced injury in rat testis. *Turkish Journal of Medical Sciences* 45: 517-525.
89. Ulug P, Oner G (2014). Evaluation of the effects of single or multiple dose methotrexate administration, salpingectomy on ovarian reserve of rat with the measurement of anti-Müllerian hormone (AMH) levels and histological analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 181: 205-209.
90. Yeh J, Kim BS, Liang YJ, Peresie J (2009). Gonadotropin stimulation as a challenge to calibrate cisplatin induced ovarian damage in the female rat. *Reproductive Toxicology* 28: 556-562.
91. Benian A, Guralp O, Uzun DD, Okyar A, Sahmay S (2013). The effect of repeated administration of methotrexate (MTX) on rat ovary: measurement of serum antimüllerian hormone (AMH) levels. *Gynecological Endocrinology* 29(3): 226-229.
92. Oriol B, Barrio A, Pacheco A, Serna J, Zuzuarregui JL, Garcia-Velasco JA (2008). Systemic methotrexate to treat ectopic pregnancy does not affect ovarian reserve. *Fertility and Sterility* 90(5):1579-1582.
93. Lass A (2004). Assessment of ovarian reserve: is there still a role for ovarian biopsy in the light of new data? *Human Reproduction* 19: 467-469.

94. Gol M, Saygili U, Koyuncuoglu M, Uslu T (2009). Influence of high-dose methotrexate therapy on the primordial follicles of the mouse ovary. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 35(3): 429-433.
95. Prasad S, Tiwari M, Pandey AN, Shrivastav TG, Chaube SK (2016). Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. *Journal of Biomedical Science* 23: 36.
96. Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(31): 6697-6703.
97. Öktem F, Yilmaz HR, Ozguner F, Olgar S, Ayata A, Uzar E, Uz E (2006). Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology and Industrial Health* 22: 241-247.
98. Li YM, Chan HYE, Huang Y, Chen ZY (2007). Green tea catechins upregulate superoxide dismutase and catalase in fruit flies. *Molecular Nutrition & Food Research* 51: 546-554.
99. Sayılmaz A, Karabulut YY, Özgörgülü A (2016). The histopathological evaluation of healing effects of vitamin C administered before methotrexate therapy on testicular injury induced by methotrexate. *Turkish Journal Urology*; 42(4): 235-239.
100. Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG, Spears N (2001). Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. *Reproduction* 121(1): 89-96.

10. ETİK KURUL FORMU

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Çalışmasının Adı : “Erişkin Sıçan Ovaryumunda Metotreksat Hasarına Karşı Karayemişin Etkileri”			
Çalışmacılar : Y.Doç.Dr.Gökçen KERİMOĞLU, Yük.Lis.Öğr.Canan GÜNEY, Prof.Dr.Servet KERİMOĞLU, Prof.Dr.Sevgi KOLAYLI, Prof.Dr.Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Y.Doç.Dr.Selim DEMİR			
Anabilim Dalı : Histoloji - Embriyoloji			
Etik Kurul Dosya No 2016/ 37	Etik Kurul Toplantı Tarihi 13/07/2016	Etik Kurul Toplantı No 2016-09	Etik Kurul Karar No 11
Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu’nda Prof.Dr.Bilal KUTRUP’un başkanlığında toplanıp; “Erişkin Sıçan Ovaryumunda Metotreksat Hasarına Karşı Karayemişin Etkileri” başlığını taşıyan tez çalışmanın, Karadeniz Teknik Üniversitesi’nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (13.07.2016)  Prof. Dr. Bilal KUTRUP Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı			

11. ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : GÜNEY, Canan
Uyruğu : T.C
Doğum tarihi ve yeri : 07.10.1992 / ÜSKÜDAR
Medeni hali : Bekar
E-Posta : canangguney@gmail.com
Yazışma adresi : Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	: Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2019
Lisans	: Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2014
Lise	: Mevlana Lisesi	2010

AKADEMİK/ MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre
Biyolog	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi	2017-Halen

YABANCI DİL İngilizce

YAYINLAR

Kerimoğlu G, Güney C, Ersöz Ş, Odacı E (2018). A histopathological and biochemical evaluation of oxidative injury in the sciatic nerves of male rats exposed to a continuous 900-megahertz electromagnetic field throughout all periods of adolescence. Journal of Chemical Neuroanatomy 91: 1-7.