



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI
OVARYUM HASARINA KARŞI
YABAN MERSİNİNİN
(*Vaccinium myrtillus*)
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Gamze BİLGİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU

TRABZON-2020



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI
OVARYUM HASARINA KARŞI
YABAN MERSİNİNİN
(*Vaccinium myrtillus*)
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Gamze BİLGİN
ORCID: 0000-0001-5596-8914

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU
ORCID: 0000-0002-4349-7796

TRABZON-2020

ONAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Gamze BİLGİN'in hazırladığı "Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Ovaryum Hasarına Karşı Yaban Mersininin (*Vaccinium myrtillus*) Et-kilerinin İncelenmesi" başlıklı çalışma Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU

(Danışman)

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Prof. Dr. Levent TÜMKAYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne/...../20..... tarihinde teslim edilen bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../20..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak 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 kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih
Gamze BİLGİN
(İmza)

İthaf

Bu yüksek lisans tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana bilgi ve deneyimleri ile yön gösteren, desteğini her zaman hissettiren, güler yüzünü benden hiç esirgemeyen ve hayatıma katmış olduğu önemini onur duyarak hissettiğim, sevgili tez danışmanım Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim süresince katkılarını esirgemeyen değerli hocalarım, Prof. Dr. Engin YENİLMEZ, Prof. Dr. Esin YULUĞ, Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU ve Öğr. Gör. Dr. Derya ÖZTÜRK OKATAN'a,

KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Servet KERİMOĞLU'na ve Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Selim DEMİR'e ve

Tez sürecimin öncesi de dahil olmak üzere, en zor ve en güzel zamanlarımda hep yanımda olan ve bundan sonraki yürüdüğüm yolda da benimle olacaklarından emin olduğum Canan GÜNEY ve Gökay ALP'e

Sağlık Bilimleri Enstitüsü hocalarıma, deney süresince yardımını esirgemeyen arkadaşım Ali KULABER ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki bütün çalışma arkadaşlarıma,

Ayrıca tez çalışmama, TYL-2019-8298 nolu proje ile destek veren Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Sevgilerini her daim en içten bir şekilde hissettiğim, bu günlere gelebilmemde hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, bana olan güvenlerinden güç aldığım başta canım babam Hüseyin BİLGİN'e, değerini hiçbir zaman anlatarak kelimelere sığdıramayacağım herşeyim annem Zeliha BİLGİN'e, kardeşlik duygusunu bana en güzel şekilde hissettiren canım kardeşim Enes BİLGİN'e ve kocaman ailemin diğer fertlerine, bana hep en iyileri yaşattıkları için sonsuz teşekkür ederim, iyi ki varsınız...

Yük. Lis. Öğr. Gamze BİLGİN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ovaryum	3
2.1.1. Ovaryum Embriyolojisi	4
2.1.2. Ovaryum Anatomisi	5
2.1.3. Ovaryum Genel Histolojisi	5
2.1.4. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi	6
2.1.4.1. Primordiyal Folikül	7
2.1.4.2. Primer Folikül	8
2.1.4.3. Sekonder Folikül	9
2.1.4.4. Tersiyer Folikül	9
2.1.4.5. Atretik Folikül	10
2.1.5. Ovaryum Rezervi	11
2.2. Metotreksat	12
2.2.1. Kimyasal Yapısı	12
2.2.2. Etki Mekanizması	12
2.2.3. Yan Etkileri	13
2.3. Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	13

2.4. Yaban Mersininin Genel Özellikleri	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. Deneysel Çalışma Aşaması	17
3.2. Deney Hayvanları, Laboratuvar Koşulları ve Deney Uygulamaları	17
3.3. Etanollü YME Hazırlanması	19
3.3.1. YME'nin Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi	20
3.3.2. YME'nin Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi	20
3.3.3. YME'nin Demir İndirgeyici Gücünün Belirlenmesi	21
3.4. Histolojik Analizler	23
3.4.1. Ovaryum Doku Numunelerinin Elde Edilmesi	23
3.4.2. Dokuların Takip, Histolojik Boyama ve Değerlendirme Aşamaları	23
3.4.2.1. Hematoksilin ve Eozin (H&E) Boyama Yöntemi	24
3.4.2.2. Masson Trikrom Boyama Yöntemi	25
3.4.2.3. Histolojik Değerlendirme Yöntemi	25
3.5. Biyokimyasal İncelemeler	26
3.5.1. Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanışı	27
3.5.2. Doku Örneklerinin Protein Miktarının Belirlenmesi	27
3.5.3. Ovaryum Dokusu MDA Tayini	27
3.5.4. Ovaryum Dokusu 8-OHdG Tayini	28
3.5.5. Ovaryum Dokusu TAS ve TOS Tayini	28
3.5.6. Ovaryum Dokusu OSI Tayini	29
3.5.7. Ovaryum Dokusu SOD Tayini	29
3.5.8. Ovaryum Dokusu CAT Tayini	29
3.5.9. Ovaryum Dokusu Kaspaz-3 Tayini	30
3.6. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR	32
4.1. Histolojik Bulgular	32
4.2. Ovaryum Dokularının Biyokimyasal Bulguları	40
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
7. KAYNAKLAR	50
EKLER	62
EK 1. Etik Kurulu Onayı	64



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Etanollü YME hazırlama işlem basamakları	19
Tablo 2.	YME'nin toplam fenolik içeriğinin belirlenmesi	20
Tablo 3.	YME'nin toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi	21
Tablo 4.	YME'ye ait demir indirgeyici gücün belirlenmesi	22
Tablo 5.	H&E boyama aşamaları	24
Tablo 6.	Masson Trikrom boyama aşamaları	25
Tablo 7.	Biyokimyasal parametrelerin ölçümü için dokuların hazırlanışı	27
Tablo 8.	Folikül sayılarının gruplar arasında karşılaştırılması	33
Tablo 9.	Ovaryum dokularının biyokimyasal bulguları	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Ovaryum yapısı	3
Şekil 2. Ovaryum anatomisi ve genel histolojisi	5
Şekil 3. Oogenez ve folikül gelişimi	6
Şekil 4. Primordiyal folikül	7
Şekil 5. Primer folikül	8
Şekil 6. Sekonder folikül	9
Şekil 7. Tersiyer folikül	10
Şekil 8. MTX'in moleküler yapısı	12
Şekil 9. SOD enziminin süperoksitten hidrojen peroksit katalizi	14
Şekil 10. Deney grupları ve deney uygulamaları	18
Şekil 11. Toplam fenolik içerik belirlenmesinde kullanılan standart grafiği	20
Şekil 12. Toplam flavonid içerik belirlenmesinde kullanılan standart grafiği	21
Şekil 13. Demir indirgeyici güç belirlenmesinde kullanılan standart grafiği	22
Şekil 14. Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği	28
Şekil 15. Doku 8-OHdG ölçümünde kullanılan standart grafiği	28
Şekil 16. Doku SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği	29
Şekil 17. Doku CAT ölçümünde kullanılan standart grafiği	30
Şekil 18. Doku kaspaz-3 ölçümünde kullanılan standart grafiği	30
Şekil 19. Gruplara ait folikül sayılarındaki değişimlerin grafiği	32
Şekil 20. Gruplara ait dokulardaki vazodilatasyon/konjesyon skorları	38
Şekil 21. Gruplara ait dokulardaki kollajen ve fibröz doku skorları	38

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. Yaban mersini meyvesi (2019, Trabzon)	15
Resim 2. Sıçanlar ve deney boyunca bakımın sağlandığı standart tip III kafesler	17
Resim 3. Bir deneğe MTX uygulaması	18
Resim 4. Gavaj için hazırlanmış YME ve YME'nin gavaj yoluyla verilmesi	19
Resim 5. Sıçanlarda ovaryumların çıkarılması	23
Resim 6. Sıçan ovaryum dokusuna ait bir kesitte korpus luteum (mavi ay), primordiyal folikül (turuncu ok), erken (tek katlı) primer folikül (sarı çember), sekonder folikül (beyaz çember), içinde oosit (beyaz yıldız) ve ZP (mavi ok başı) görülmekte (H&E x 400)	26
Resim 7. Kontrol grubuna ait sıçan ovaryum dokusuna ait kesitte, ovaryum medullası (sarı yıldız) ve korteksi (kırmızı ay) görülmekte (H&E x40)	33
Resim 8. Kontrol grubuna ait sıçan ovaryumunda korpus luteum (ay), çok katlı primer folikül (mavi çember) ve primordiyal foliküller (turuncu oklar) görülmekte. Primer foliküller içinde primer oosit (beyaz yıldız) izlenmekte (H&E x200)	34
Resim 9. Kontrol grubuna ait kesitte ovaryumu saran germinal epitel tabakası (beyaz ok), folikülü çevreleyen teka eksterna (kırmızı ok), teka interna (kırmızı çift yönlü ok) tabakaları ve oositi çevreleyen ZP (mavi ok başı) ve oositin nükleusu (beyaz ok başı) görülmekte (H&E x 400)	34
Resim 10. Kontrol grubuna ait kesitte folikülün teka eksterna (kırmızı ok), teka interna (kırmızı çift yönlü ok) tabakaları ve foliküle ait oositin (beyaz yıldız) ZP'si (mavi ok başı) görülmekte (H&E x 400)	35
Resim 11. MTX grubuna ait kesitte görülen yoğun vazodilatasyon/konjesyon (kırmızı yıldız), folikül hücre sınırlarının kaybolduğu fokal nekroz alanları (mavi şimşek) ve bir sekonder folikül (beyaz çember) izlenmekte (H&E x 200)	36

- Resim 12.** MTX grubuna ait kesitte fokal nekroz alanları (mavi şimşek) ve ödem (mavi çarpı) izlenmekte (H&E x 400) 36
- Resim 13.** MTX+YME grubuna ait kesitte ovaryumun etrafını saran germinal epitel (beyaz ok) ve korpus luteum (ay) görülmekte. Tersiyer folikülde (yeşil çember), teka eksterna tabakası (kırmızı ok), teka interna tabakası (kırmızı çift yönlü ok), granüloza hücreleri (mavi çift yönlü ok), antrum (sarı ok), oosit (beyaz yıldız), ZP (mavi ok başı), korona radiata hücreleri (pembe ok) izlenmekte (H&E x200) 37
- Resim 14.** MTX+YME grubuna ait bir kesitte; germinal epitel tabakası (beyaz ok), sekonder folikül (beyaz çember) ve ödem (mavi çarpı) görülmekte (H&E x 400) 37
- Resim 15.** Kontrol grubuna ait bir kesitte primordiyal foliküller (turuncu ok) görülmekte. Sekonder folikül içindeki oositi çevreleyen düzenli mavi renkte ZP (mavi ok başı) görülmekte (Masson Trikrom, x 400) 39
- Resim 16.** MTX grubuna ait kesitte, dejenere olmuş bir oositin geride kalan düzensiz ve sekonder foliküldeki (beyaz çember) oositi çevreleyen düzenli mavi boyanan ZP (mavi ok başı) izlenmekte. Yoğun mavi boyalı kollajen ve fibroz doku (yeşil yıldız) artışı olduğu görülmekte (Masson Trikrom, x 400) 39
- Resim 17.** MTX+YME grubuna ait kesitte düzensiz mavi boyanan ZP (mavi ok başı) ve kollajen ve fibröz doku (yeşil yıldız) artışının azaldığı görülmekte (Masson Trikrom, x 400) 40

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AMH	Anti mülleriyan hormon
CAT	Katalaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FSH	Folikül stimüle edici hormon
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
H&E	Hematoksilen ve eozin
HNE	4-Hidroksinonenal
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ip.	İntraperitoneal
KE	Kuersetin eşdeğeri
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
KTÜCAM	Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi
MDA	Malondialdehid
MTX	Metotreksat
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
OSİ	Oksidatif stres indeksi
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PGH	Primordiyal germ hücresi
pH	Hidrojenin gücü
R²	Korelasyon katsayısı

RNA	Ribonükleik asit
ROT	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SD	Standart deviasyon
SF	Serum fizyolojik
SOD	Süperoksit dismutaz
TAS	Total antioksidan kapasite
TE	Troloks eşdeğeri
TOS	Total oksidatif kapasite
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Deoxyuridine Triphosphate Nick End Labeling Assay
YME	Yaban mersini ekstraktı
yy	Yüzyıl
ZP	Zona pellusida
8-OHdG	8-hidroksideoksiguanozin

Simgeler

&	Ve
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar

M Molar

Nmol Nanomol

n Birey sayısı

ng Nanogram

nm Nanometre

μL Mikrolitre

μg Mikrogram

μm Mikrometre

μM/ μmol Mikromolar

Xg Kütleçekimsel

Formüller

C₂₀ H₂₂ N₈ O₅ MTX

CH₃ Metil

H₂ Hidrojen

H₂O Su

H₂O₂ Hidrojen peroksit

NH₂ Amin

O₂ Oksijen

O₂· Süperoksit radikali

ÖZET

Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Ovaryum Hasarına Karşı Yaban Mersininin (*Vaccinium myrtillus*) Etkilerinin İncelenmesi

Bu çalışmanın amacı yöresel olarak yetişen ve antioksidan özelliğe sahip olan yaban mersininden elde edilen ekstraktın (YME), bazı kanser türleri ve romatizmal hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik bir ilaç olan metotreksat (MTX)'in over dokusunda oluşturacağı hasara karşı histolojik ve biyokimyasal etkilerini araştırmaktır.

Bu çalışmada, 21 erişkin dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele her grupta 7 sıçan olmak üzere 3 gruba ayrıldı. İlk grup kontrol grubu olup, hiçbir işlem uygulanmadı. İkinci grup MTX grubu olup tek doz intraperitoneal (ip.) 30 mg/kg MTX uygulandı. Üçüncü grup ise MTX+YME grubu olup; tek doz ip. 30 mg/kg MTX ve 5 gün oral gavaj ile 200 mg/kg YME uygulandı. Deney sonunda sıçanlar sakrifiye edilip ovaryumları çıkarıldı. Sağ ovaryumdan alınan kesitler, hematoksilen ve eozin (H&E) ve masson trikrom ile boyandıktan sonra histopatolojik olarak değerlendirildi ve kesitlerdeki primordiyal, primer, sekonder, tersiyer ve atretik foliküller sayıldı. Ayrıca sol ovaryum dokuları biyokimyasal incelemeler için alınarak malondialdehid (MDA), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), total antioksidan kapasite (TAS) ve total oksidatif kapasite (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ), 8-okso-deoksiguanozin (8-OHdG) ve kaspaz-3 seviyeleri analiz edildi.

Biyokimyasal incelemelerde MTX grubu MDA değerinin hem kontrole hem de MTX+YME grubuna göre yüksekti. MTX grubuna ait dokularda belirgin fokal nekroz alanları, vazodilatasyon/konjesyon, ödem, dejenere oositler ve kollajen ve fibröz doku artışı tespit edildi. MTX+YME grubunda bu patolojik bulguların MTX grubuna göre azaldığı görüldü. MTX ve MTX+YME gruplarındaki atretik folikül sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksekti.

Sonuç olarak MTX, ovaryum dokusunda oksidatif strese neden olarak histopatolojik hasar oluşturabilir; YME uygulaması, MTX'in oluşturduğu oksidatif stres ve doku hasarını azaltmada etkili olabilir.

Anahtar Kelimeler: İnfertilite, Metotreksat, Oksidatif stres, Ovaryum, Yaban mersini

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Blueberries (*Vaccinium myrtillus*) Against Methotrexate Induced Ovary Damage in Rats

The aim of this study is to investigate histological and biochemical effects of the extract, obtained from locally grown blueberries (YME) which have antioxidant properties, against the damage of ovarian tissue by the chemotherapeutic drug Methotrexate (MTX), which is widely used in the treatment of several types of cancer and rheumatic diseases.

In this study, 21 female adult rats were used. Rats were randomly divided into 3 groups as 7 rats in each group. The first group is the control group and no procedure was applied. The second group was the MTX group and a single dose of 30 mg/kg MTX was administered intraperitoneally (ip.). The third group was MTX+YME group; a single ip. dose of 30 mg/kg MTX and 200 mg/kg YME were administered by oral gavage for 5 days. At the end of the experiment, rats were sacrificed and their ovaries were extracted. Sections obtained from the right ovarian tissues, after being stained with Hematoxylin & Eosin (H&E) and Masson Trichrome, were evaluated histologically and primordial follicles, primary follicles, secondary follicles, tertiary follicles and atretic follicles were counted. In addition, left ovarian tissues were extracted for biochemical examinations, and malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (TAS) and total oxidative capacity (TOS), oxidative stress index (OSI), 8-oxodeoxyguanosine (8-OHdG) and caspase-3 levels were analyzed.

In the biochemical analyses, the level of MDA in the MTX group was higher both in comparison to the control group and MTX+YME group. Notable regions with focal necrosis, vasodilatation/congestion, edema, degenerated oocytes and increased in collagen and fibrous tissue were observed in the tissues extracted from MTX group. A decrease in the aforementioned pathological findings of MTX+YME group has been observed, in comparison to the MTX group. The number of atretic follicles was statistically higher both in the MTX and MTX+YME groups, relative to the control group.

As a result, MTX might lead to histopathological damages by causing oxidative stress in the ovarian tissue and the administration of YME might be effective in reducing the oxidative stress and tissue damage caused by MTX.

Key Words: Blueberry, Infertility, Methotrexate, Ovary, Oxidative stress

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünyadaki ölüm sebeplerinin başında gelen kanser, başlangıçta normal olan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölündüğü ve anormal hücrelerin oluştuğu bir süreci ifade etmektedir. Organizmada serbest radikallerin artması ve antioksidanların etkilerinin azalması pek çok hastalığın yanında kanser oluşumunda da rol oynayabilir (1, 2).

Kanser tedavisinde uzun yıllardır kullanılan kemoterapötikler ve tedavi teknolojilerinde olumlu yöndeki ilerlemeler kanser hastalarında sağkalım oranlarını artırmıştır. Ancak tedavide kullanılan kemoterapötiklerin istenmeyen etkileri halen tam olarak engellenememektedir ve bu istenmeyen etkilerden biri de infertilite veya fertilitenin azalmasıdır. Kadınlarda kemoterapötik ilaçların kullanılması, erken ovaryan yetmezlik ve infertiliteye sebep olabilir (3, 4). Antioksidan tedavilerin bu olumsuz durumları önlemede etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır ve yapılmaktadır (5-7).

Kanser tedavilerinde yaygın bir şekilde kullanılmakta olan kemoterapötik ajanlardan biri de MTX'tir (8). İlave olarak MTX, dihidrofolat redüktaz enziminin etkilerini engelleyen bir folik asit analogu olup, romatoid artrit ve sedef hastalığı gibi bazı otoimmün hastalıklarda da kullanılan etkili bir tedavi ajanıdır (9, 10). Diğer kemoterapötikler gibi MTX de kanser için tedavi edici etkilerinin yanında istenmeyen etkilere de sahiptir. MTX'in başlıca yan etkileri hepatotoksisite ve nefrotoksisite olup hem hepatositlerde, hem de glomerüler ve tübüler hücrelerde oksidatif strese neden olabilir. Özellikle hızlı bölünen hücrelerden olan kan kök hücreleri, trofoblast hücreleri ve gonadal hücreler, MTX'in istenmeyen etkilerine daha sık maruz kalabilir. Bu istenmeyen etkilerin, hücrelerde azalmış nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) seviyeleri ve artan reaktif oksijen türleri (ROT) sebebiyle oluşabileceği bildirilmiştir (11).

Antioksidanlar, ROT'un zararsızlaştırılmasına katkı yaparlar. Bu etkileriyle, kanser ve diğer birçok hastalığın önlenmesinde etkili oldukları yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Meyveler ve meyvelerdeki doğal bileşiklerin hastalıklarla mücadele etme ve sağlıklı yaşlanmaya yardım etmedeki rolleri, tüm dünyada bilim adamlarınca araştırılmaktadır (12). Bazı meyvelerde bulunan antosiyanidinler ve diğer fenolikler ROT ile savaşmak için gerekli yüksek antioksidan özelliklere sahiptirler. Türkiye'de yaygın olarak yetiştirilen yaban mersini de bu maddeler yönünden zengin bir içeriğe sahiptir (5, 13).

Yaban mersini, *Vaccinium* cinsine ait olup 200'ün üzerinde türe sahiptir. Yerli Avrupa yaban mersini (*Vaccinium myrtillus*), Kuzey Amerika highbush (*Vaccinium corymbosum*) ve lowbush (*Vaccinium angustifolium*) ise en bilinen türlerdir. Yaban mersini

meyveleri, geleneksel tıpta gastrointestinal sistem ve diyabetik rahatsızlıkların tedavisinde çay veya likör olarak kullanılmaktadır (14). Antosiyanin, flavonoid ve fenolik asit içeriğinden oldukça zengin olan yaban mersinindeki bu bileşiklerin; antioksidan, antimutagenik, antikanserojenik, antienflamatuar, antihipertansif, antihiperlipidemik, antiproliferatif ve antimikrobiyal etkileri gösterilmiştir (15).

Doğal bir antioksidan olan yaban mersini bir serbest radikal temizleyici gibi davranarak serbest radikallerin; damar, bağırsak, kalp, retina gibi organlara zarar vermesini önleyebilir (15-18).

Bu bilgiler ışığında çalışmamız; erişkin dişi sıçanlarda MTX'in sebep olduğu ovaryum hasarına karşı yüksek antioksidan içeriğe sahip yaban mersininin muhtemel iyileştirici etkilerinin araştırılmasını amaçlamıştır. İlave olarak güncel literatürde MTX kaynaklı ovaryum hasarına karşı yaban mersininin etkilerini araştıran bir çalışma bulunamamıştır. Bu nedenle çalışmamızla literatürdeki bu boşluğun doldurulması ve bu konuyla ilgili klinik çalışmalara basamak olması hedeflenmiştir.

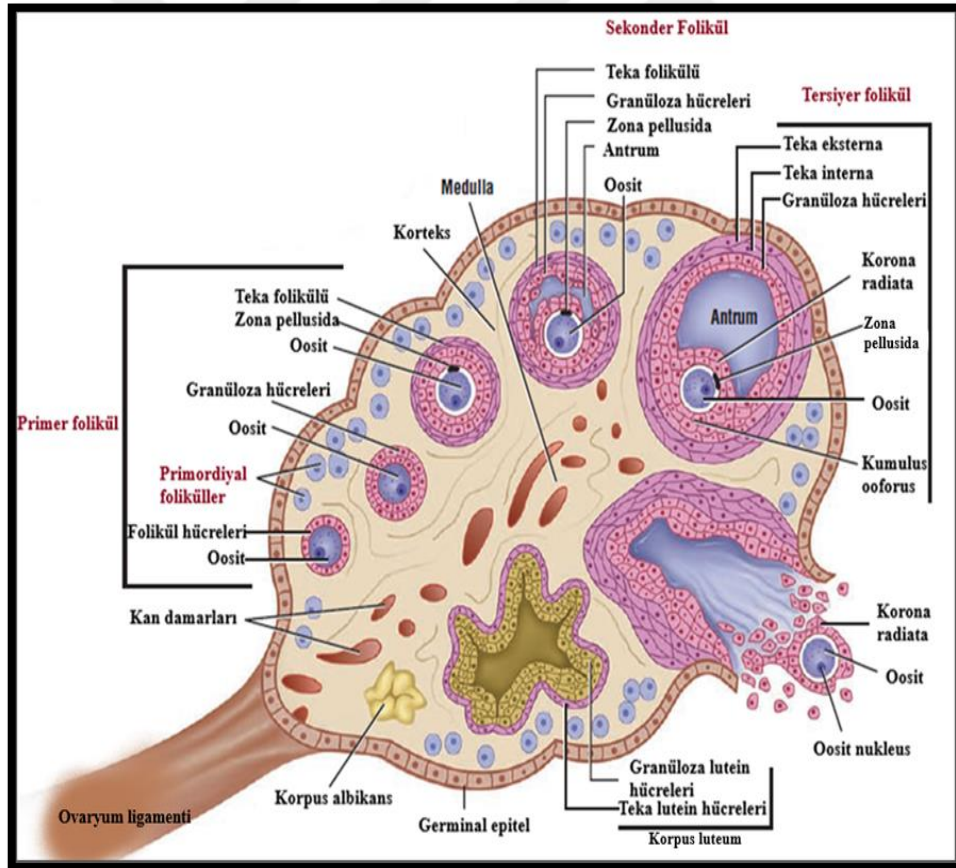
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum

16. yy'dan önce dişi testisi olarak adlandırılan ovaryum; Von Bear'ın ovaryum foliküllerinin memeli yumurtalarının kaynağı olduğunu keşfetmesinden sonra kadın üreme sisteminin temel yapılarından biri olarak kabul görmüştür (19).

Ovaryum, dişilerin üremesi için endokrin ve ekzokrin iki ana salgılama fonksiyonuna sahip olup döngüsel olarak değişen salgılama yapan dinamik bir organdır (20, 21).

Ovaryumun ekzokrin işlevi oosit üretmek iken; endokrin işlevi ise oositin olgunlaşmasını, olgun oositin fertilizasyon için serbest bırakılmasını, ayrıca dişilerin ikincil eşey karakterlerinin oluşmasını ve gebeliğin meydana gelmesini etkin kılan steroidler üretmektir (22). Ovaryum dış kısımda farklı aşamalardaki foliküllerin bulunduğu korteks ve iç kısımda vaskülarize bağ doku yapısındaki medulladan oluşur (23) (Şekil 1).



Şekil 1. Ovaryum yapısı (Eroschenko'dan, 23)

2.1.1. Ovaryum Embriyolojisi

Embriyonun dişi mi erkek mi olacağı her ne kadar fertilizasyon sırasında genetik olarak belirlense de; gonadlar 7. haftaya kadar yapısal olarak aynı görünümündedirler (24).

Primordiyal germ hücreleri (PGH), epiblastlardan köken alır ve erken embriyonik gelişim sürecinde yolk kesesi endoderm hücreleri arasında tanımlanır (24, 25). Dördüncü haftada göçe başlayan PGH, ilkel dorsal mezenter üzerinden geçerek altıncı haftada gonadal sırtlar içinde yayılmaya başlarlar. Bu dönemden önce yoğunlaşmış mezenşim ve üstündeki proliferen epitelden oluşan ilkel gonadlar; karın arka duvarında gonadal sırt olarak adlandırılan bir çift kabarıklıktan ibarettirler (24). Bu göç sırasında PGH çoğunlukla gonada ulaşırken bazen hücrelerin bazıları ya da tümü dorsal mezenterde ya da mezenşimde kalarak başarısızlığa uğrayabilirler. PGH'ler; ovaryumda oositin oluşmasında, testislerde spermilerin oluşmasında rol alan diploid yapıdaki hücrelerdir (26). Eğer PGH hücreleri gonadal sırtı ulaşmazsa indüktif etkiden mahrum kalan gonadlar gelişemez (24, 25).

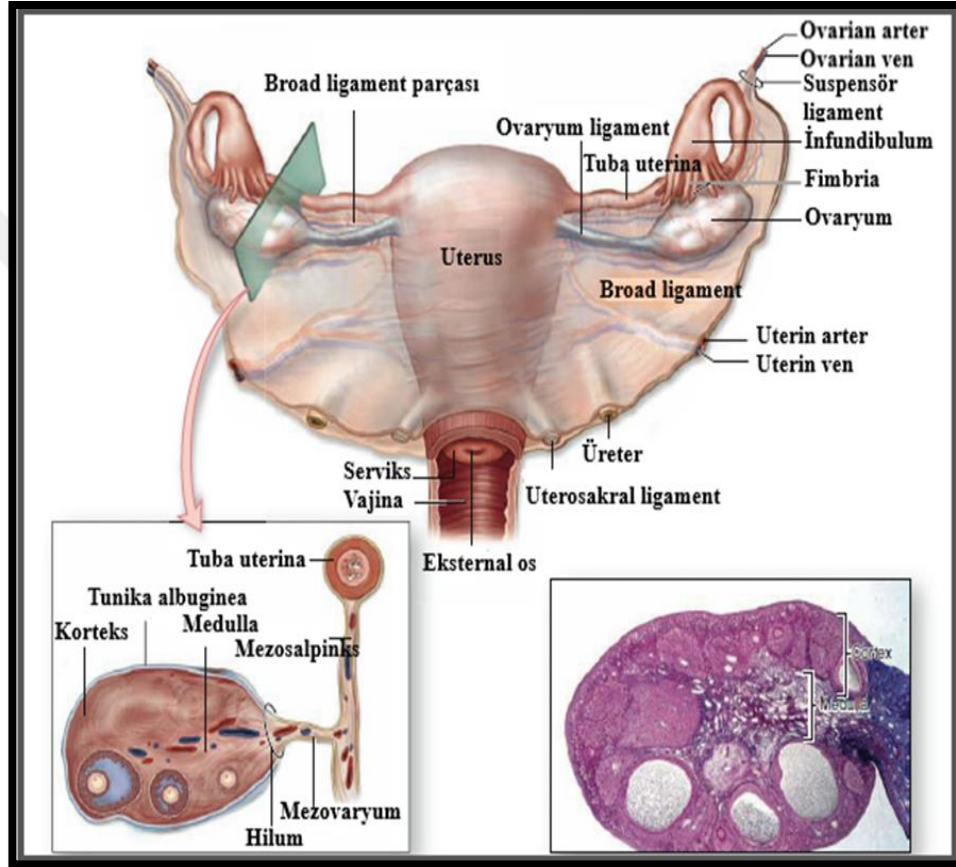
Genetik olarak ister dişi ister erkek olsun, hem over hem de testis geliştirebilme kapasitesinde olduğundan embriyonun gonadları biseksüel yani ünisekstir (27). Farklanmamış üniseks gonadlarda, genital sırt epitelinin çoğalarak alttaki mezenşim içinde oluşturduğu kordonlara primitif seks kordonları denir ve bu kordonlar yüzey epiteli ile devam ederler. Dişi cinsiyette daha sonra bu kordonlar, gonadın medullasına doğru uzanır ve hücre gruplarına ayrılarak kordon yapısını kaybeder ve yerini vasküler gevşek bağ doku yapısındaki ovaryum medullasına bırakır. Y geni yokluğunda yani XX kromozomu varlığında PGH de oogonyumlara farklanır, oogonyumlar çoğalır ve 1. Mayozun profaz evresine girerek diploid yapıdaki primer oositleri oluştururlar (24, 28). İntrauterin beşinci aydan önce sayı 7 milyona ulaşırken oositlerin bir kısmı doğumdan önce bir kısmı da çocukluk çağı süresince atreziye uğrar. Ancak atrezinin sonraki yıllarda da devam etmesiyle adolesana gelindiğinde kalan ortalama 40 bin oositin tüm üretken çağ boyunca sadece 500 kadarı olgun evreyi görebilir.

Yüzey epiteli ise yeniden proliferen olarak yüzeyle bağlantılarını koruyan ve kortikal kordonlar olarak adlandırılan yeni kordonlar yapar (24). Bu kordonlar da hücre kümelerine ayrılır ve foliküler hücreler olarak adlandırılan yüzey epiteli kaynaklı bu hücreler her bir oositin etrafını çevreleyerek yedinci ayda primordiyal folikül yapısının görülmesini sağlar.

İntrauterin dönemde oluşan primordiyal foliküllerin içindeki primer oositler menstrüel sıklarla seçilene kadar bu evrede beklerler ve dişinin tüm üreme çağı boyunca kullanacağı over rezervini oluştururlar (24, 28).

2.1.2. Ovaryum Anatomisi

Ovaryumlar yaklaşık olarak uzunlukları 3 cm, genişlikleri 1.5 cm ve kalınlıkları 1 cm olan badem şeklindeki bir çift organdır (29). Ovaryumların her biri üst kısımlarından ligamentum suspansoryum ovarii (süspensör ligament) ile pelvis yan duvarına; alt kısımlarından ise ligamentum ovarii proprium ile uterusu asılır (30, 31) (Şekil 2).



Şekil 2. Ovaryum anatomisi ve genel histolojisi (Mescher'den, 31)

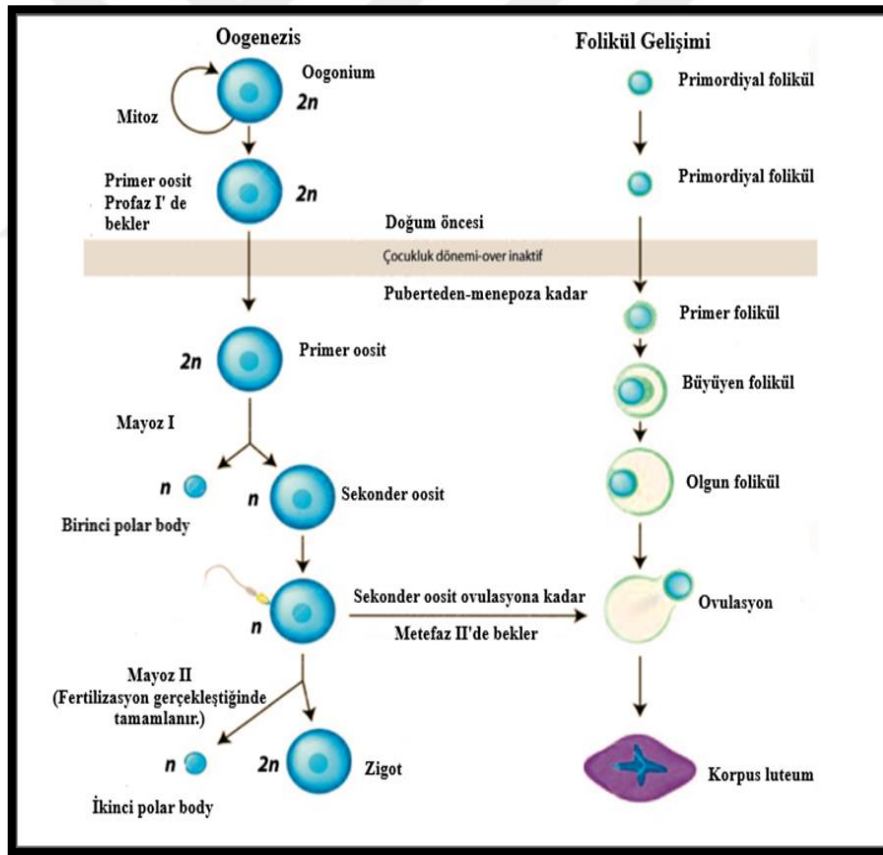
2.1.3. Ovaryum Genel Histolojisi

Ovaryumlar germinal epitel olarak bilinen kübik ya da skuamöz tek sıra hücre tabakasıyla çevrilidir. Germinal epitel altında ise tunika albuginea denilen, testiste de bulunan yoğun kollajenöz bağ doku tabaka ile çevrilmiştir (23, 32, 33). Tunika albuginea tabakasının altında ovaryumun korteks kısmı bulunur (23, 33).

Ovaryum korteks ve medulla olarak adlandırılan iki ana kısımdan oluşur. Kortekste ovaryum foliküllerinin gelişimi meydana gelir ve bu foliküller de oosit, granüloza ve teka hücreleri ile çevre somatik hücrelerden oluşur. Medullada ise damar ve sinir yapıları bulunur (19, 33).

2.1.4. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi

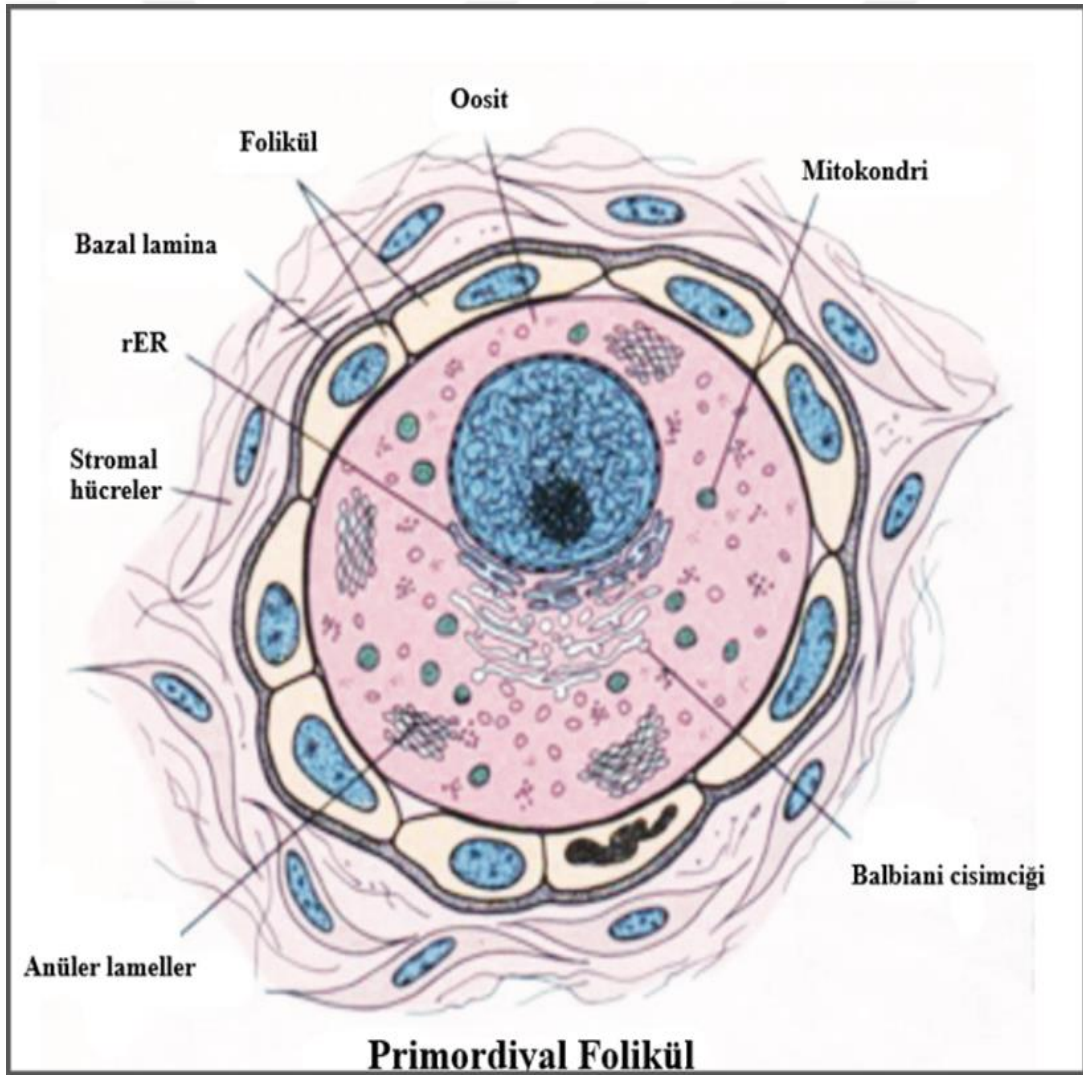
Dişilerde üreme devam ettiği sürece her ay, folikül gelişimine başlamak için rezerv folikül havuzundan bir grup primordiyal folikül etkinleştirilir. Böylece seçilmiş foliküldeki oositin de gelişimine kaldığı yerden devam etmesiyle döllenmeye hazır oositi içeren olgun (tersiyer) folikül meydana gelir (34). Primordiyal foliküller, bir antral kaviteye sahip tersiyer folikülü oluşturmadan önce büyüyerek sırasıyla primer (erken-geç) ve sekonder folikül evrelerinden geçer (22, 30, 33, 35) (Şekil 3).



Şekil 3. Oogenezis ve folikül gelişimi (Karakoç'tan, 35)

2.1.4.1. Primordiyal Folikül

Primordiyal folikül, ovaryumda gerçekleşen folikülogenezde görülen ilk foliküldür. Primordiyal folikül; 1. Mayozun diploten evresinde beklemekte olan belirgin nükleoluslu perifer yerleşimli nükleusa sahip bir primer oosit ve onları çevreleyen tek katlı yassı granüloza hücrelerinin birlikteliğinden oluşmaktadır (Şekil 4). Primordiyal foliküller genellikle dinlenme havuzu folikülleri olarak adlandırılmaktadırlar. Primordiyal foliküllerde belirgin bir teka tabakası yoktur (36, 37). Dişinin üretken dönemi boyunca sürececek uzun folikül gelişimi sırasında; ergenlik dönemi başlangıcında sayıları oldukça fazla olan primordiyal foliküllerin büyük bölümü atreziye uğrayarak kaybolacaktır (38).



Şekil 4. Primordiyal folikül (Ross ve Pawlina'dan, 30)

2.1.4.2. Primer Folikül

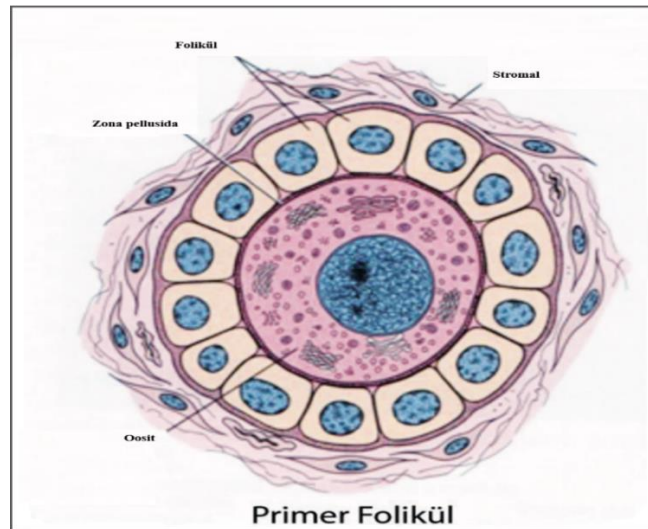
Seçilen primordiyal folikülün gelişmesi ile oosit, folikül hücreleri ve stromada bazı farklılıklar görülmektedir. Bu farklılıklar, primer folikül içindeki oositin büyümesi ve yassı olan folikül hücrelerinin küboidal şekle dönüşerek granüloza tabakasını oluşturmasıdır.

Kübik foliküler hücreler görüldüğünde artık primer folikülden sözedilir (30) (Şekil 5). Primer folikül gelişirken; oositin çekirdeğinin yanında yerleşik olan Golgi aparatı sitoplazmada daha geniş alana yayılır, mitokondriler bölünür, serbest ribozomlar ve granüllü endoplazmik retikulum daha fazla görülmeye başlar ve oosit büyür (32).

Primer foliküllerde zona pellusida (ZP) glikoproteinlerinin salgılanması ile (ZP1, ZP2, ZP3) oosit ve folikül hücreleri arasında ZP denilen ve oogenez, fertilizasyon, preimplantasyon dönemlerinde görev alan özel bir tabaka oluşmaktadır (30, 39). Aralarındaki bu tabakaya rağmen; folikül hücreleri uzantıları ve oositler de mikrovillusları ile ZP içinden geçerek birbirleriyle temaslarını devam ettirirler (30, 32).

Folikül gelişirken, stromal hücreler teka foliküli denilen kılıf ile foliküllerin etrafını sarar ve teka foliküli ile stratum granülozum arasında da bir bazal lamina bulunur. Gelişen teka foliküli; teka interna ve teka eksterna denilen iki tabakaya ayrılır ancak aralarındaki sınır net değildir (32).

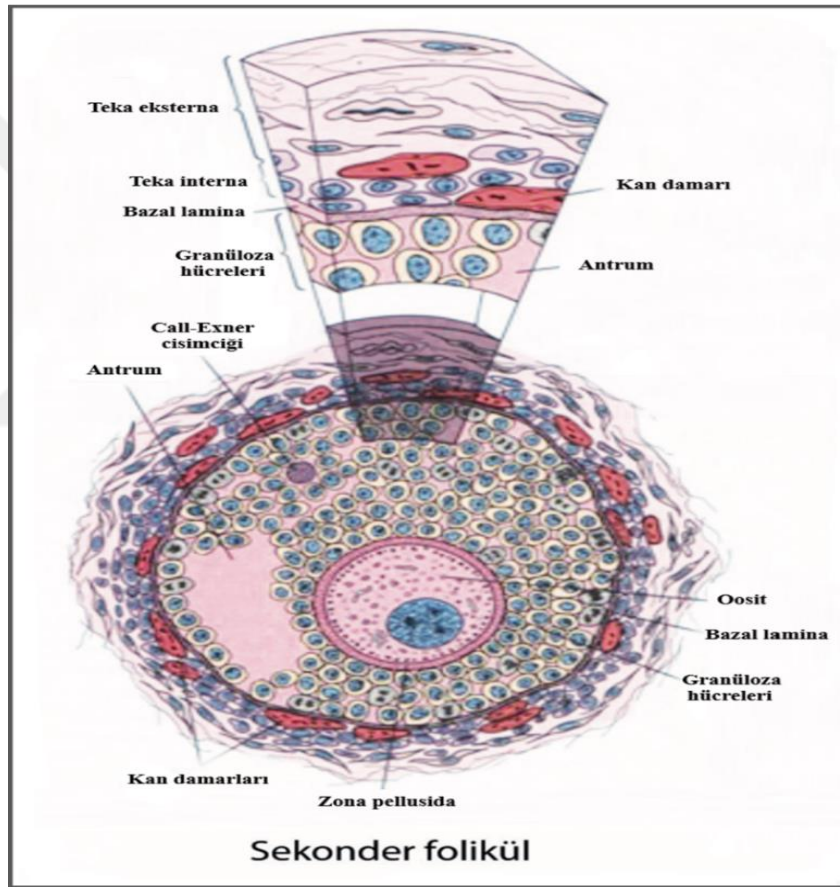
Tek tabakalı küboidal folikül hücresi tabakasının gelişen oositi çevrelemesi ile oluşan foliküle erken primer folikül denilirken; çok katmanlı granüloza hücre tabakasının oositi çevrelemesiyle artık oluşan folikül geç primer folikül olarak adlandırılır (30).



Şekil 5. Primer folikül (Ross ve Pawlina'dan, 30)

2.1.4.3. Sekonder Folikül

Sekonder folikül oluşurken primer folikülün yapısı değişir ve 8-12 tabakaya ulaşmış granüloza hücrelerinin aralarında sıvı dolu boşluklar görülmeye başlar (32, 33) (Şekil 6). Bu hücrelerin arasındaki boşluklar birleşerek içi folikül sıvısı ile dolu daha büyük boşluklar meydana getirir; primer oositin çapı daha da genişler ve bu foliküle artık sekonder folikül adı verilir (33). Visköz ve saydam olan folikül sıvısında; glikozaminoglikanlar, aralarında steroid bağlayıcı proteinlerin de bulunduğu birkaç protein ve bol miktarda steroid hormonlar bulunur (31).



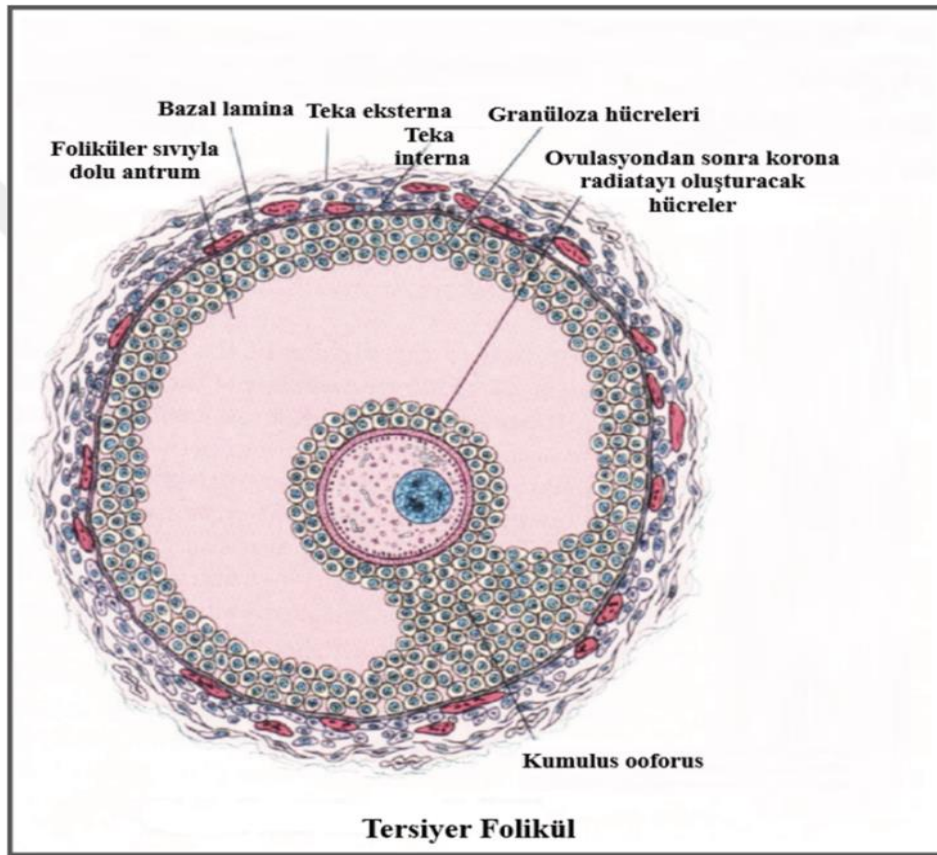
Şekil 6. Sekonder folikül (Ross ve Pawlina'dan, 30)

2.1.4.4. Tersiyer Folikül

Sekonder foliküldeki sıvı dolu boşlukların büyümesi ve birleşmesiyle artık tek bir boşluk haline gelen antrum çepeçevre granüloza hücresi ile döşelidir. Primer oosit bir kutba çekilerek etrafını saran ilk sıra granüloza hücreleri (korona radiata), ve onları çevreleyen ve

antrum duvarına tutturarak diğer granuloza hücreleriyle (kumulus ooforusu) antrum içine sarıkan bir tepelik oluşturur (33) (Şekil 7).

Ovulasyondan kısa süre öncesinde gözle görülebilecek boyuta ulaşan tersiyer folikül içindeki primer oosit, mayoz bölünmesine devam eder ve perivitellin boşluğa bir kutup cisimciği atarak 2. mayozun metafazında tekrar duraksar. Oluşan haploid kromozomlu oosit artık sekonder oosit olarak adlandırılır (24).



Şekil 7. Tersiyer folikül (Ross ve Pawlina'dan, 30)

2.1.4.5. Atretik Folikül

Folikül gelişiminin intrauterin dönemde başlaması gibi; bazı foliküllerde meydana gelen yapısal bozulma olarak tanımlanabilen atrezi de intrauterin dönemde başlar ve reproduktif dönemin bitişine kadar sürer. Foliküler atrezinin altında yatan mekanizmanın apoptoz olduğu düşünülmektedir (40, 41).

Atretik foliküle ait granüloza hücreleri öncelikle birbirleriyle bağlantılarını kaybederler, piknotik ve koyu boyalı hücreler olarak görülürler. Daha sonra hücrelerde sitoplazmik vakuoller, nükleer ve sitoplazmik kondensasyon ve fragmentasyonlar görülür ve çoğu ortadan kalkar. Oosit de küçülüp dejenere olurken ZP kollabe olur ancak varlığını bir süre daha devam ettirir (41, 42).

Bu foliküllerin sayısının artması canlılar üzerindeki stres faktörünün artmasıyla da ilişkilidir (43).

2.1.5. Over Rezervi

Over rezervi, geleneksel anlamda dişilerin üreme verimliliğini, ovaryumların barındırdığı oosit miktarını ve bu oositlerin kalite durumunu ifade etmekle birlikte; modern anlamda oositin kalitesinden daha çok oosit sayısı ile ilişkili bir durum olarak tanımlanmaktadır (44).

Klinikte over rezervini belirlemede; biyokimyasal olarak inhibin, östradiol, folikül stimüle edici hormon (FSH), anti müllerian hormon (AMH) gibi hormonların ölçümü, folikül sayımının yapılması ve ovaryum boyutlarının ölçülmesi gibi ultrasonografik ölçümler kullanılmaktadır (45). Bu testler her ne kadar klinik için yaygın ve kullanışlı olsa da deneysel çalışmalarda histolojik olarak yapılan folikül sayımları over rezervini belirlemede etkin ve önemli bir yöntemdir (46).

Dişiler doğduklarında yaklaşık olarak 2 milyon foliküle sahiptirler ve bu folikül sayısı doğal bir süreç olarak menarşın başında 40.000'e düşmektedir. Bir kadının folikül sayısında 30'lu yaşlardan sonra aşırı bir azalma meydana gelir ve folikül sayısı yaklaşık olarak 25.000 civarına iner (47, 48).

Dişi ovaryumları, ergenlik döneminden menopoz dönemine kadar, primordiyal foliküllerde yerleşmiş ve döllenme yeteneği olan oositlere sahiptirler (49). Yaşa bağlı olarak over rezervinde azalma olması; geri döndürülemeyen ve dişilerde bulunan primordiyal foliküllerin sayısının azalmasıyla birliktelik gösteren bir süreçtir (48).

Genetik bazı anomaliler, pelvik bölgeye radyoterapi uygulanması ve sistemik kemoterapötik kullanımı gibi bazı faktörler de oosit kalite ve sayısında bozulmaya neden olarak fertilitiyi düşürebilir (45).

Kemoterapötik ilaçların foliküller üzerinde gösterdikleri direkt toksik etkinin yanında ovarian vasküler yapıda ve bağ dokuda yaptıkları olumsuz etki de ovarian hasara katkıda bulunabilir (46).

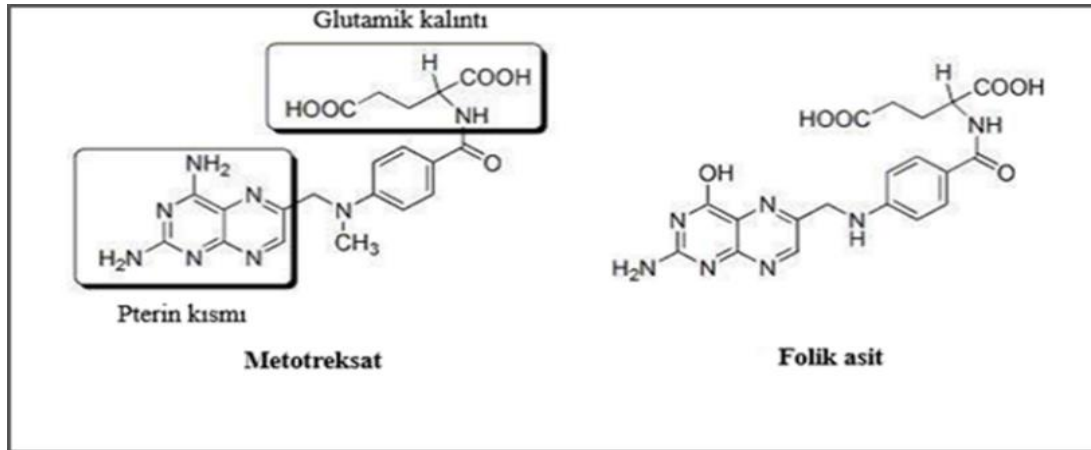
2.2. Metotreksat

İlk olarak çocukluk lösemisinin tedavisinde kullanılan MTX, bir folik asit antagonisti olarak deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) sentezinde görev alan dihidrofolat redüktaz enzim inhibitörü olan bir ilaçtır (50, 51).

Malign tümörlerin tedavisinde kullanılan MTX; bunların yanı sıra psöriyazis, psöriyatik artrit ve romatoid artrit gibi non malign bazı kronik hastalıkların tedavisinde de immü-niteyi baskılamak amacıyla kullanılmaktadır (50, 52).

2.2.1. Kimyasal Yapısı

MTX ($C_{20}H_{22}N_8O_5$), DNA sentez ve tamirinden sorumlu olan dihidrofolat redüktaza bağlanıp; timidilat ve pürin sentezini bozarak ve hücre proliferasyonunu azaltarak birçok metabolik yola etki eder. Pteridin halkalı folik asitin ilave bir amino grubu (NH_2) ve bir metil grubu (CH_3) eklenmiş bir analogu olan MTX, antienflamatuar ve immünosupresif etkilere de sahiptir (53-56) (Şekil 8).



Şekil 8. MTX'in moleküler yapısı (Ma'dan, 51)

2.2.2. Etki Mekanizması

MTX; DNA sentezini bozar ve aktif T hücrelerinin apoptozunun gerçekleşmesine yol açarak nötrofillerdeki kemotaksiyi baskılar. Ayrıca proinflatuvar sitokin sentezinin

azaltılmasını sağlar (55, 57). Sonuç olarak MTX, hücre metabolizmasında tetrahidrofolat bağımlı tüm basamakları bozar (53).

2.2.3. Yan Etkileri

Diğer pek çok kemoterapötik gibi MTX de tedavi edici etkilerinin yanında çok sayıda organ ve dokuda neden olduğu hasara bağlı yan etkilere sahiptir. Miyelosüpresyon, mukozit, nefrotoksisite, hepatotoksisite ve akut veya kronik ensefalopati ile nörotoksisite bunlardan bazıları olup doz artışı bu etkileri artırmaktadır. Bunların yanında bulantı, mide şikayetleri, saç dökülmesi, ishal ve bağırsak iltihabı da MTX tedavilerinde en sık rastlanan yan etkilerdendir (58, 59). İlave olarak uzun süreli ve kümülatif MTX dozları erken overiyen yetmezliğe ve erken menapoza da neden olabilir (60).

2.3. Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Serbest radikaller; bir ya da daha fazla sayıdaki eşleşmemiş elektronlu ve kararsız kimyasal yapılar olup biyolojik sistemlerde normal aerobik metabolizmanın sonucu üretilmelerinin yanında homeostazisi bozan hastalık, radyasyon ve bazı kimyasalların neden olduğu anormal reaksiyonlar sonucunda da ortaya çıkabilirler (61-63).

Organizmada; hidroksil, süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılan oksijen kökenli serbest radikallere ilave olarak karbon ve azot kökenli serbest radikaller de bolca bulunur. Aktif moleküller olan serbest radikaller; hücre sinyal yolları, apoptozis ve prostoglandin sentezi gibi pek çok fizyolojik olayda önemli rol oynarlar (63-65).

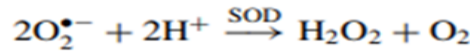
Normal şartlarda hücrelerin oksijen kullanımıyla mitokondri tarafından üretilen ROT'un antioksidan sistemlerce dengelenmeyen aşırı üretimi; hücrede lipidlere, proteinlere zarar verebilir ve nükleik asitleri bozarak DNA zincir kırıklarına neden olabilir (64-67).

Oksidatif stres; artan veya antioksidan sistemlerce nötralize edilemeyen ROT'un hücre ve dokularda yarattığı hasarı temsil eder. Artan oksidatif stres; hipertansiyon ve ateroskleroz gibi kardiyovasküler, alzheimer ve demans gibi nörolojik, romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklarda ve hatta kanser patogeneğinde rol oynamaktadır (66). İlave olarak kadın infertilitesi ve gametleri üzerinde de oksidatif stresin negatif etkileri bilinmektedir (68).

Bu nedenle oksidatif stres önlemek, artan ROT'ları zararsızlaştırmak ve olumsuz etkilerini nötralize etmek için görev yapan; organizmada üretilen endojen ve dışarıdan be-

sinlerle alınan ekzojen antioksidanlar oldukça önemlidir (66, 69, 70). Endojen antioksidanlar; serbest radikallere karşı enzimatik ve enzimatik olmayan bir savunma sistemi oluştururlar. Enzimatik endojen antioksidanlar; SOD, CAT, glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerden oluşurken; non enzimatik endojen antioksidanlar ise lipoik asit, bilirubin, ferritin, laktoferrin, seruloplazmin ve glutatyon (GSH) gibi bileşiklerdir (66, 69).

Enzimatik bir antioksidan olan SOD enzimi, bir ROT olan süperoksitten yine bir başka ROT olan hidrojen peroksit oluşumunu katalizleyerek ROT zararsızlaştırılmasındaki ilk basamakta rol oynar (Şekil 9). Oluşan hidrojen peroksit ise CAT ve GPx tarafından katalizlenen başka bir reaksiyonla suya dönüştürülerek zararsızlaştırılır (70).



Şekil 9. SOD enziminin süperoksitten hidrojen peroksit katalizi (Valko'dan, 62)

Oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin herhangi bir sebeple bozulması sonucunda artan ROT, biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonunun başlamasına neden olabilir. Bu zincirleme devam eden peroksidasyon reaksiyonları sonucunda MDA, akrolein ve 4-Hidroksinonenal (HNE) gibi bileşikler oluşur ve bu bileşiklerden özellikle MDA membranlar gibi yoğun lipid içeren yapılarda ROT'a bağlı hasarın önemli göstergelerindendir (71, 72). Nötralize edilemeyen ROT'un DNA'daki nükleik asitlere saldırısı sırasında oluşan 8-OHdG ise ROT kaynaklı DNA hasarının tespitinde kullanılmaktadır (73).

TAS ölçümü ise, besinlerin ve canlı organizmaların antioksidan seviyesini belirlemede çok sık kullanılan bir yöntemdir (74). Biyolojik canlılarda fazla sayıda oksidan ve antioksidan molekül bulunması ve bunların her birinin ayrı ayrı tespit edilmesinin hem maddi hem manevi olarak zor bir işlem olmasından dolayı TAS ve TOS seviyelerinin ölçümü kullanışlı olabilir (75, 76). Organizmadaki oksidatif stresin belirteci olan OSİ de TOS'un TAS'a oranının yüzdesi olarak tanımlanmaktadır (76).

Serbest radikallerin olumsuz etkilerinden kaçınmak ve bağışıklık sistemini güçlendirmek için antioksidan enzim bakımından zengin gıdaların tüketilmesi büyük önem taşır

(69, 77). Bitki ve meyvelerde bulunan fenolikler, flavonoidler ve vitaminler yüksek derecede antioksidan bileşiklerdir (78). Bitkiler, bu oldukça zengin antioksidan içerikleri sayesinde serbest radikallerle savaşarak oksidatif stres kaynaklı hastalıkların tedavi ve önlenmesinde faydalı olabilirler (69).

2.4. Yaban Mersininin Genel Özellikleri

Kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve serebrovasküler hastalıklar gibi patolojik durumlara karşı savunmada; meyve tüketiminin önemli bir yeri vardır ve bunun nedeni, bu gıdalardaki antioksidan vitaminler ve polifenolik antioksidanlardır (79). Geçmişte tıbbi bir bitki olarak bilinen yaban mersini de antioksidan kapasitesi ve antikanserojen etkileri nedeniyle neredeyse dünyanın hemen her yerinde günden güne popüleritesini arttıran bir meyve olmuştur (80) (Resim 1).

Ericaceae familyasından olan *Vaccinium*; ılıman iklim koşullarında yetişen ve kışın yapraklarını döken üzüksü, mavi- siyah veya mor renkte bir meyvedir (80, 81).



Resim 1. Yaban mersini meyvesi (2019, Trabzon)

Antioksidan kapasite ve antikanserojenik etkileri nedeniyle dünyada özellikle Kuzey Amerika ve batı Asya da; ülkemizde ise Artvin, Rize, Trabzon, Ordu, Giresun, Gümüşhane, Samsun, Sinop, Kastamonu, Zonguldak, Bolu, Bartın, Düzce, Kocaeli, Sakarya, İstanbul, Kırklareli, Bursa, Balıkesir, Erzurum ve Ardahan gibi illerde yetişmektedir.

Dünyada yaban mersini olarak bilinen *Vaccinium*'un Türkiye'de, *V. Vitis-idea*, *V. myrtillus*, *V. uliginosum* ve *V. arctostaphylos* gibi türleri mevcuttur. Yaban mersini; Rize'de likapa ve kaskanaka, Trabzon'da ligarba, Artvin'de mostvi, morsvi ve merhauk, Ordu ve Giresun'da çalı çileği, Ardahan'da göğen ve diğer illerde çay üzümü ve ayı üzümü gibi değişik isimlerle anılmaktadır (80, 82).

Yaban mersini; yapısında oldukça fazla miktarlarda doğal antioksidanlar, antikarsinojenler, fenolik asitler ve flavonoidler bulundurulur. Meyvelerdeki flavonoid alt gruplarından olan antosiyaninler, toksik etkiler göstermeyen ve birçok hastalığın engellenmesinde antioksidan etkiye sahip ilgi çekici renklerdeki pigmentlerdir (80, 83). Antioksidan etkileri oldukça fazla olan antosiyaninler, serbest radikalleri zararsızlaştırarak kanser ve diğer birçok hastalığın önlenmesinde önemli etkiye sahiptir (84-87). Yabani bir meyve olan yaban mersini de tadının iyi olması yanında; yapısında bulunan askorbik asit, polifenoller ve 15 farklı antosiyaninin sağladığı antioksidan özellikler nedeniyle faydalı bir meyvedir. Siyanidin-3 glukozit, delfinidin-3-glukozit, malvidin-3-glukozit, petunidin-3-glukozit ve delfinidin-3-galaktozid (%8.98) yaban mersininde bulunan başlıca temel antosiyaninlerdir (80, 83).

Bazı deneysel çalışmalar, yaban mersininin bir serbest radikal temizleyicisi gibi davranarak; damar dokuları, bağırsak, kalp ve retina gibi organlarda serbest radikallere bağlı hasarı önlediğini göstermiştir (13, 15).

Sonuç olarak yaban mersini, antioksidan ve antikanserojen etkilerinin yanında anti-enflamatuar, antimikrobiyal, hipoglisemik, kardiyoprotektif ve nöroprotektif etkilere sahip fonksiyonel bir besindir (88).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deneyisel Çalışma Aşaması

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2018/23 numaralı izni ile gerçekleştirilmiş (EK.1) ve KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: TYL-2019-8298).

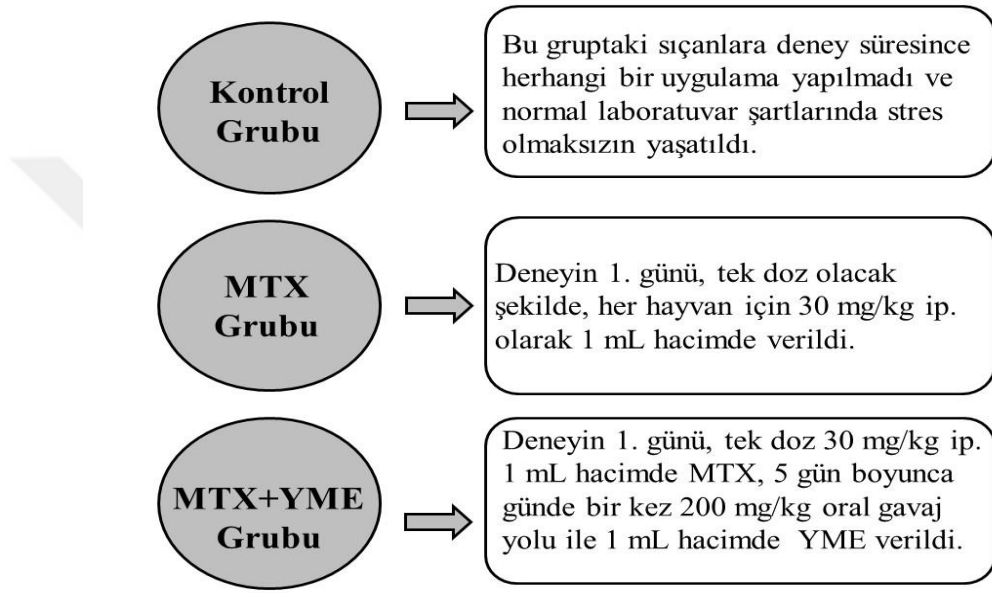
3.2. Deney Hayvanları, Laboratuvar Koşulları ve Deney Uygulamaları

Deney hayvanı olarak kullanılan sıçanlar, KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi (KTÜCAM)’nden temin edildi. Çalışmadaki sıçanların tümünün bakımı ve barınması KTÜCAM tarafından sağlandı; bu şekilde sıçanların çevre stresi ve çevreye uyum problemleri yaşamasının önüne geçilmeye çalışıldı. Çalışmada 8-10 haftalık 21 adet Sprague Dawley cinsi erişkin dişi sıçan kullanıldı. 5 günlük deney süresince laboratuvarın sıcaklığı ortalama $22\pm2^{\circ}\text{C}$, nisbi nem ortalama $\%50\pm5$ olarak ayarlandı ve sıçanların bir günlük döngüsü 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma sağlandı. Tüm sıçanlar, standart Tip III kafeslerde ve kafes üstlerine yerleştirilmiş kolayca ulaşabilecekleri standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslenerek stres faktörlerinden uzak tutuldular (Resim 2).



Resim 2. Sıçanlar ve deney boyunca bakımın sağlandığı standart tip III kafesler

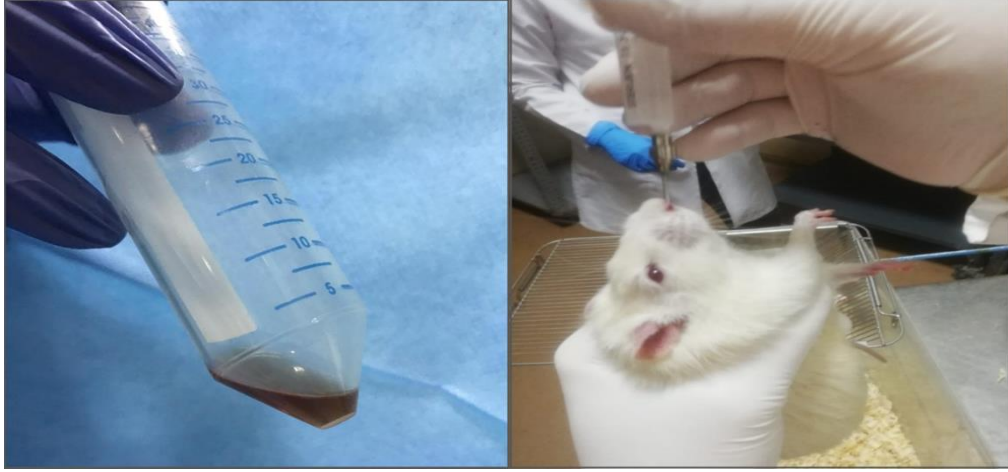
Deneye dahil edilen sıçanlar her grupta 7 sıçan olmak üzere rastgele seçilerek 3 gruba ayrıldı. Herhangi bir işlem uygulanmayan kontrol grubu, deneyin ilk günü tek doz 30 mg/kg ip. MTX verilen MTX grubu ve deneyin ilk günü tek doz 30 mg/kg ip. MTX verildikten sonra aynı günden başlanarak 5 gün boyunca oral gavajla 200 mg/kg hazırlanmış YME verilen MTX+YME grubu oluşturuldu ve ilaç dozları literatüre göre belirlendi (89, 90) (Şekil 10) (Resim 3, 4).



Şekil 10. Deney grupları ve deney uygulamaları



Resim 3. Bir deneğe MTX uygulaması



Resim 4. Gavaj için hazırlanmış YME ve YME'nin gavaj yoluyla verilmesi

Deneyin sonunda hayvanlar derin anestezi altında kansızlaştırma yöntemi ile sakrifiye edildi. Ovaryumlar cerrahi olarak çıkarıldı (Resim 5). Sağ ovaryum dokuları %10 formalin ile tespit edildi ve sol ovaryum dokuları biyokimyasal analize kadar -80°C 'de saklandı.

3.3. Etanollü YME Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan olgun yaban mersini meyve örnekleri 2019 yılı yaz mevsiminde Trabzon'dan toplandı ve toplanan meyve numuneleri çeşitli işlemlerden geçirilerek YME hazırlandı (91, 92) (Tablo 1). Aşağıdaki protokole göre hazırlanan etanollü YME, deneyde kullanılmak üzere 4°C 'de karanlıkta saklandı.

Tablo 1. Etanollü YME hazırlama işlem basamakları

İşlem No	Yapılan İşlem
1	Yaban mersini meyve örnekleri 20 gün boyunca 45°C 'de kurutuldu.
2	Laboratuvar değirmeni (Retsch ZM200, Haan, Almanya) ile toz haline getirildi.
3	Toz halindeki örnekten 3 gr alınarak 30 mL saf etanol ile karıştırıldı.
4	Karışım vortekslendi ve sonra 45°C 'de 150 rpm'de sürekli çalkalanarak 24 saatlik inkübasyona bırakıldı.
5	Karışım 1800 xg'de 10 dakika santrifüjlendi.
6	Süpernatant, önce süzgeç kağıdından süzüldü ve sonra 0.2 μm 'lik filtreden geçirildi.
7	Hazırlanan etanollü YME, deneyde kullanılmak üzere 4°C 'de, karanlıkta saklandı.

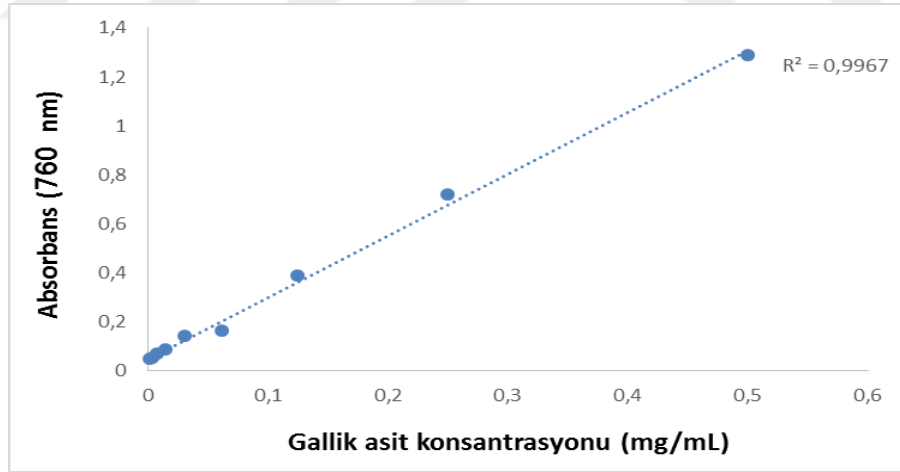
3.3.1. YME'nin Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

YME'nin toplam fenolik madde içeriği, modifiye edilmiş Folin-Ciocalteu yöntemine göre spektrofotometrik olarak belirlendi (93).

Buna göre; 12 µL örnek için Tablo 2'deki işlemler uygulandı ve toplam fenolik içerik tayininde kullanılan gallik asit standart grafiği oluşturuldu (Şekil 11) (94).

Tablo 2. YME'nin toplam fenolik içeriğinin belirlenmesi

İşlem No	Yapılan İşlem
1	12.5 µL örnek, 62.5 uL Folin reaktifi ve 125 µL %20 lik sodyum karbonat çözeltisi ile karıştırıldı.
2	Karışım oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.
3	760 nm de mikroplyt okuyucu spektrofotometrede (Molecular Devices Versamax, California, ABD) absorbans ölçümü yapıldı.
4	Standart olarak gallik asit kullanılarak toplam fenolik madde miktarı her g örnek başına mg gallik aside eşdeğer (mg GAE/g örnek) olarak hesaplandı.
5	Ölçümler üç kez yinelenerek sonuçlar aritmetik ortalama±standart sapma olarak verildi.



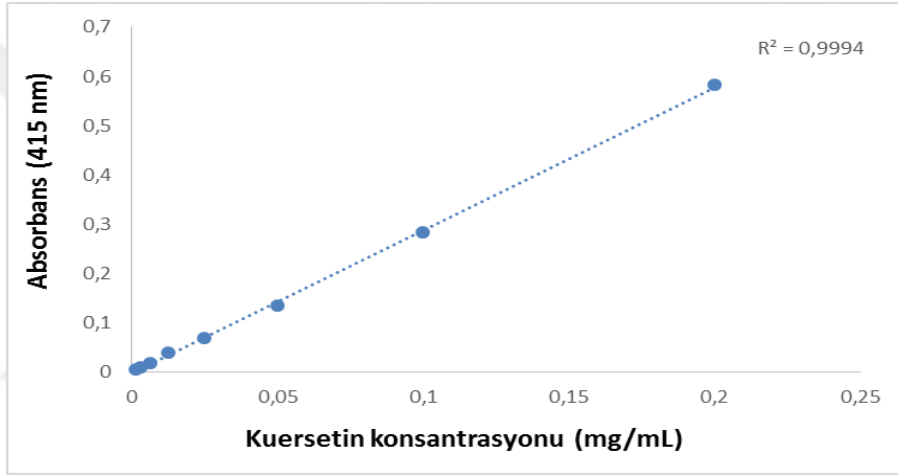
Şekil 11. Toplam fenolik içerik belirlenmesinde kullanılan standart grafiği

3.3.2. YME'nin Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Aliminyum klorür kolorimetrik yöntemi kullanılarak YME'nin toplam flavonoid içeriği belirlendi (95). Buna göre; 20 µL örnek için Tablo 3'teki işlemler uygulandı ve toplam flavonoid içerik tayininde kullanılan kuersetin standart grafiği Şekil 12'de verildi (96).

Tablo 3. YME'nin toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi

İşlem No	Yapılan İşlem
1	20 µL örnek, 172 µL %80'lik etanol, 4 µL %10'luk alüminyum klorür ve 4 µL 1 M potasyum asetat çözeltisi ile karıştırıldı.
2	Karışım oda sıcaklığında, karanlıkta 40 dakika inkübasyona bırakıldı.
3	415 nm'de mikrolept okuyucu spektrofotometrede (Molecular Devices Versamax, California, ABD) absorbans ölçümü yapıldı.
4	Standart için kuersetin kullanılarak toplam flavonoid madde miktarı g örnek başına mg kuersetin eşdeğeri (mg KE/g örnek) olarak hesaplandı.
5	Ölçümler üç kez tekrarlanarak sonuçlar aritmetik ortalama±standart sapma olarak verildi.



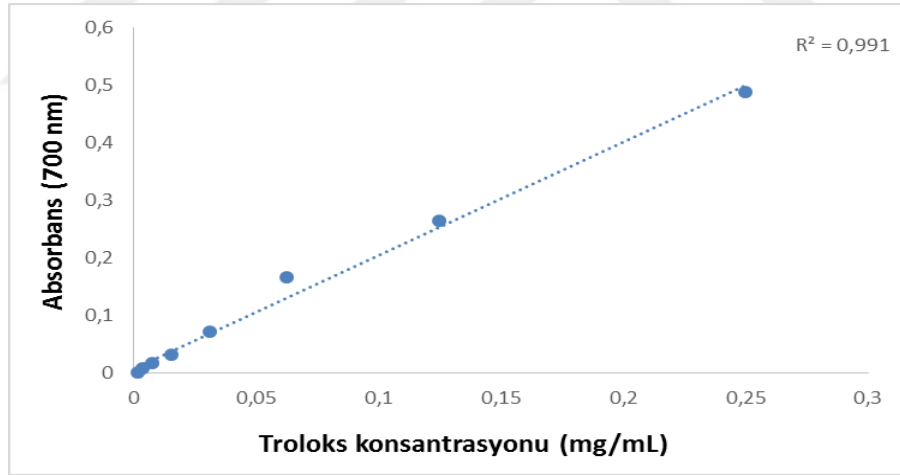
Şekil 12. Toplam flavonoid içerik belirlenmesinde kullanılan standart grafiği

3.3.3. YME'nin Demir İndirgeyici Gücünün Belirlenmesi

Oyaizu'nun geliştirmiş olduğu yöntem modifiye edilerek YME'ye ait demir indirgeyici güç belirlendi (97) (Tablo 4). Standart olarak troloks kullanılarak YME'nin demir indirgeyici gücü belirlendi ve İndirgeyici güç tayininde kullanılan troloks standart grafiği oluşturuldu (98) (Şekil 13).

Tablo 4. YME'ye ait demir indirgeyici gücün belirlenmesi

İşlem No	Yapılan İşlem
1	40 µL numune, 100 µL 0.2 M fosfat tamponu (pH:6.6) ve 100 µL potasyum ferrisiyanat ile karıştırıldı
2	Karışım 50°C'de inkübe 20 dakika edildi ve sonra su altında soğutma yapıldı
3	Karışım üzerine 100 µL %10'luk trikloroasetik asit eklendi
4	Karışım, 3000xg'de 10 dakika santrifüj uygulandı
5	Üst fazlardan 100 er µL örnek alınarak 96 kuyucuklu mikropleyte aktarıldı.
6	Mikropleytlerdeki örnekler üzerine 100 er µL distile su ve 200 µL demir (III) klorür eklendi.
7	Elde edilen son karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi
8	Süre sonunda 700 nm'de mikropleyt okuyucu spektrofotometrede (Molecular Devices, Versamax, California, ABD) absorbens ölçümü gerçekleştirildi
9	Standart olarak troloks kullanılarak YME'nin demir indirgeyici gücü g örnek başına mg troloks eşdeğeri (TE/g örnek) olarak hesaplandı.
10	Ölçümler üç kez yinelenerek sonuçlar aritmetik ortalama±standart sapma olarak verildi.

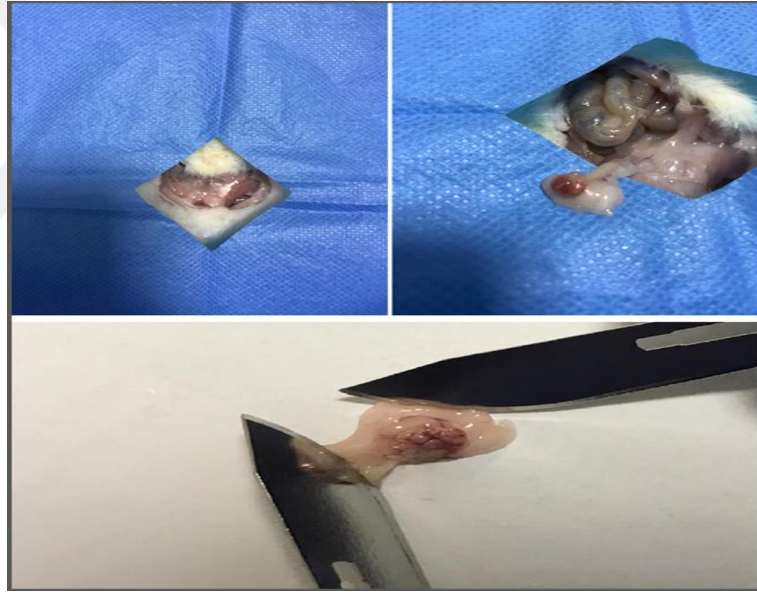
**Şekil 13.** Demir indirgeyici güç belirlenmesinde kullanılan standart grafiği

Antioksidanların aktive edilmesi için yapılan tüm analizlerde analitik veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sınıfı saflıkta olan kimyasallar (Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) kullanıldı.

3.4. Histolojik Analizler

3.4.1. Ovaryum Doku Numunelerinin Elde Edilmesi

Deneyin 6. gününde derin anestezi altındaki sıçanlar; dorso-ventral olarak diseksiyon tahtasına yatırıldı ve bisturi ile abdominal orta hattın deri insizyonu yapıldı. Daha sonra pens yardımıyla künt diseksiyon ile periton açılarak, sağ ve sol ovaryumlar etraflarındaki yağ tabakası ile birlikte çıkarıldı. Sonra ovaryumlara zarar vermeyecek şekilde etraflarındaki yağ dokusundan temizleme işlemi gerçekleştirildi (Resim 5). Temizlenen sağ ovaryumlar bütün olarak takip kasetlerine yerleştirilip numaralandırılarak %10'luk formalin solüsyonunda tespit işlemine alındı. Sol ovaryumlar soğutulmuş serum fizyolojik (SF) içinde yağ dokularından temizlenip numaralanmış ependorflara konularak biyokimyasal değerlendirmeler yapılncaya kadar -80 °C'de saklandı.



Resim 5. Sıçanlarda ovaryumların çıkarılması

3.4.2. Dokuların Takip, Histolojik Boyama ve Değerlendirme Aşamaları

Etraflarındaki yağ dokuları uzaklaştırılan tüm sağ ovaryum dokularına 3 gün %10'luk formalin solüsyonunda tespit işlemi uygulandı. Fikse olan dokular laboratuvarlarımızdaki 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 gömüldü ve parafin bloklar elde edildi.

Parafin bloklardan KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarındaki yarı otomatik mikrotom cihazı (Leica Biosystems RM2245 Semi-Automated Rotary Microtome, Leica Microsystems Ltd., Nussloch, Almanya) yardımıyla önce 20 µm'lik kesitlerle trimleme işlemi yapılarak dokuya ulaşıldı. Daha sonra dokuya ulaşıldığında dokudan 5 µm'lik seri kesitler alındı. Alınan kesitler benmari içine konularak sıcak su ile kırışıkların açılması için bekletildi ve açılan dokular rodajlı lamalar üzerine alındı.

3.4.2.1. Hematoksilen ve Eozin (H&E) Boyama Yöntemi

Alınan ovaryum kesitlerinden her denek için rastgele seçilen beş kesit H&E boyama için zembillere yerleştirildi ve parafinin uzaklaştırılması için 58°C'lik etüvde 1 saat bekletildi. Parafini eriyen kesitler daha sonra uygun protokole göre belirli sürelerde belirtilen kimyasallarda tutularak boyandı (Tablo 5).

Tablo 5. H&E boyama aşamaları

İşlem	İşlem Süresi
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
%100'lük alkol	5 dakika
%96'lık alkol	5 dakika
%70'lik alkol	5 dakika
Distile su ile hidrasyon	2-3 dakika
Hematoksilen	35 saniye
Musluk suyu ile yıkama	5 dakika
Asit alkol	Batır çıkar
Distile su yıkama	1 dakika
Amonyaklı su	10 saniye
Distile su yıkama	1 dakika
Eozin	30 saniye
Distile su yıkama	1 dakika
%70'lik alkol	5 dakika
%96'lık alkol	5 dakika
%100'lük alkol	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Entellan ve lamel ile kapatma	

3.4.2.2. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Masson Trikrom ile yapılacak boyama için alınan kesitler 58°C'lik etüvde 1 saat bekletilip parafin eridikten sonra ksilen ve azalan alkol serilerinden geçirilerek deparafinasyon işlemi uygulandı. Daha sonra her bir kesit üzerindeki dokular, 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 (Tablo 6).

Tablo 6. Masson Trikrom boyama aşamaları

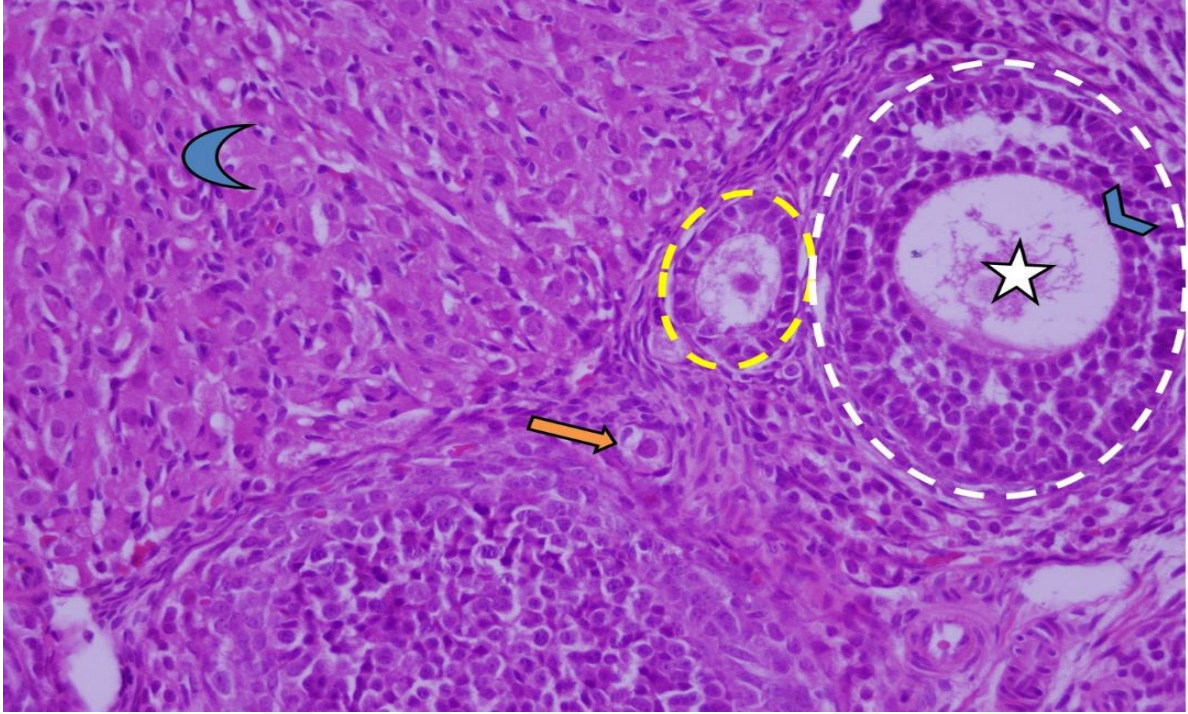
İşlem	İşlem Süresi
5 damla A- Weigert demirli hematoksislen ve 5 damla B- Weigert demirli hematoksislen karıştırılma ve doku üzeri kaplama	10 dakika
Ayıraç uzaklaştırma	
Kurutma	30-60 dakika
10 damla C- Pikrik asit alkolik çözeltisi ile kaplama	4 dakika
Ayıraç uzaklaştırma	
Distile su ile yıkama	3-4 saniye
10 damla D- Gelincik kızılı fuksin çözeltisi ile kaplama	4 dakika
Ayıraç uzaklaştırma	
Distile su ile yıkama	3-4 saniye
10 damla E- Fosfomolibdik asit çözeltisi ile kaplama	10 dakika
Ayıraç uzaklaştırma	
Kurutma	5 dakika
Entellan ve lamel ile kapatma	

3.4.2.3. Histolojik Değerlendirme Yöntemi

Tespit ve takip işlemlerinden geçirilip daha sonra parafin bloklardan alınan ve H&E ile boyanan kesitler ışık mikroskopunda (Olympus BX 51, Japonya) histopatolojik değişiklikler açısından değerlendirildi ve fotoğraflandı (Olympus, DP 71, Japonya).

Dokudaki vasküler konjesyon; (vasküler konjesyon yok: 0, hafif vasküler konjesyon: 1, orta vasküler konjesyon: 2, şiddetli vasküler konjesyon: 3 olacak şekilde) derecelendirildi. İlave olarak bu kesitlerdeki tüm (primordiyal, primer, sekonder, tersiyer ve atretik) foliküller belirlenerek ayrı ayrı sayıldı (99) (Resim 6).

Masson Trikrom ile boyanan kesitlerde de fibröz doku ve kollajen artışı (fibröz doku ve kollajen artışı yok: 0, hafif fibröz doku ve kollajen artışı: 1, orta fibröz doku ve kollajen artışı: 2, şiddetli fibröz doku ve kollajen artışı: 3 olacak şekilde) sınıflandı.



Resim 6. Sıçan ovaryum dokusuna ait bir kesitte korpus luteum (mavi ay), primordiyal folikül (turuncu ok), erken (tek katlı) primer folikül (sarı çember), sekonder folikül (beyaz çember), içinde oosit (beyaz yıldız) ve ZP (mavi ok başı) görülmekte (H&E x 400)

3.5. Biyokimyasal İncelemeler

Sıçanlardan alınan sol ovaryum dokularında;

- MDA,
- 8-OHdG,
- TAS ve TOS,
- OSİ,
- SOD,
- CAT ve
- Kaspaz-3 seviyeleri analiz edildi.

3.5.1. Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanışı

Dişi sıçanlardan alınan sol ovaryumlarda, belirtilen oksidan ve antioksidan parametrelerin belirlenebilmesi için dokulara öncelikle aşağıdaki işlemler uygulandı (Tablo 7).

Tablo 7. Biyokimyasal parametrelerin ölçümü için dokuların hazırlanışı

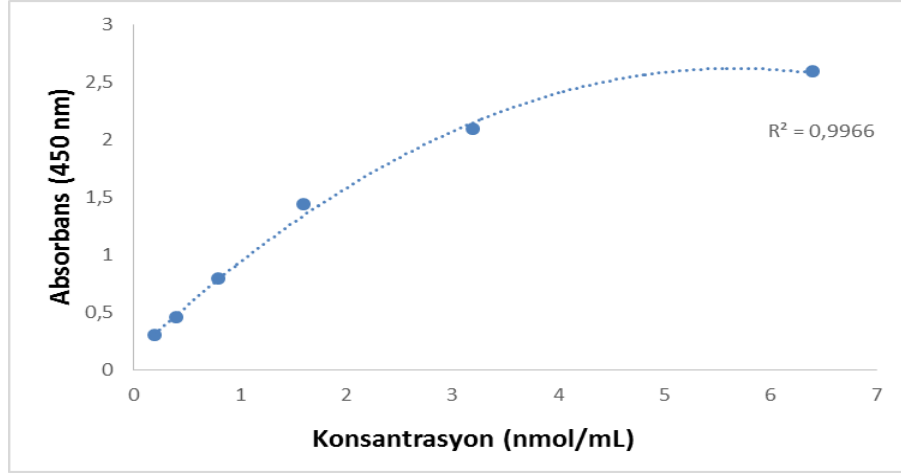
İşlem No	Yapılan İşlem
1	Dokuların herbirinden yaklaşık 30'ar mg'lık kesimler yapıldı.
2	Dokular homejenizatör (IKA Ultra-Turrax T-25, Staufen im Breisgau, Almanya) yardımı ile 2 mL fosfat tamponu (PBS, pH: 7.4) içinde 9500 rpm'de homojenize edildi.
3	Elde edilen homojenatlar 1800xg'de 10 dakika santrifüje edildi.
4	Tüm parametrelerin ölçümü elde edilen süpernatantlarda yapıldı.

3.5.2. Doku Örneklerinin Protein Miktarının Belirlenmesi

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

3.5.3. Ovaryum Dokusu MDA Tayini

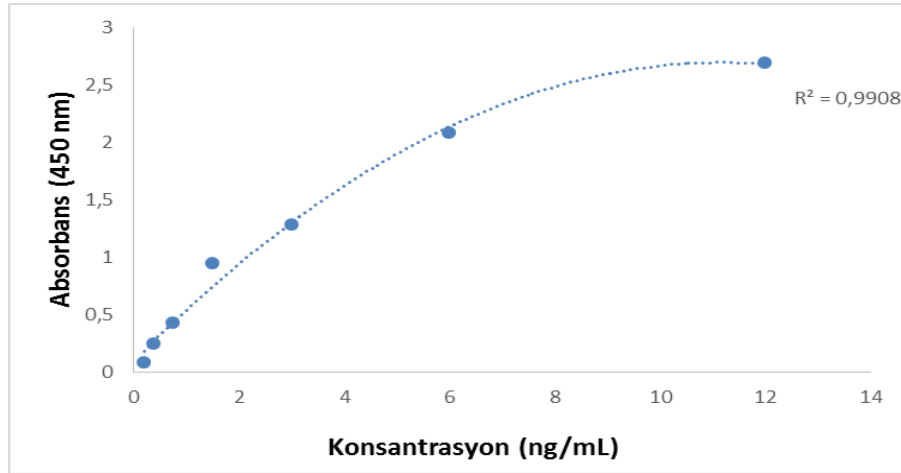
Doku örneklerinin MDA seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri ile ELISA kit (YL-Biont, Cat No: YLA0029RA, Shanghai, Çin) kullanılarak belirlendi. Sonuçlar nmol/mg protein birimiyle verildi. MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 14'de gösterildi.



Şekil 14. Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.5.4. Ovaryum Dokusu 8-OHdG Tayini

Doku örneklerinin 8-OHdG seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri ile ELISA kit (YLBiont, Cat No: YLA0061RA, Shanghai, Çin) kullanılarak belirlendi. Sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. 8-OHdG ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 15’te gösterildi.



Şekil 15. Doku 8-OHdG ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.5.5. Ovaryum Dokusu TAS ve TOS Tayini

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

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

3.5.6. Ovaryum Dokusu OSİ Tayini

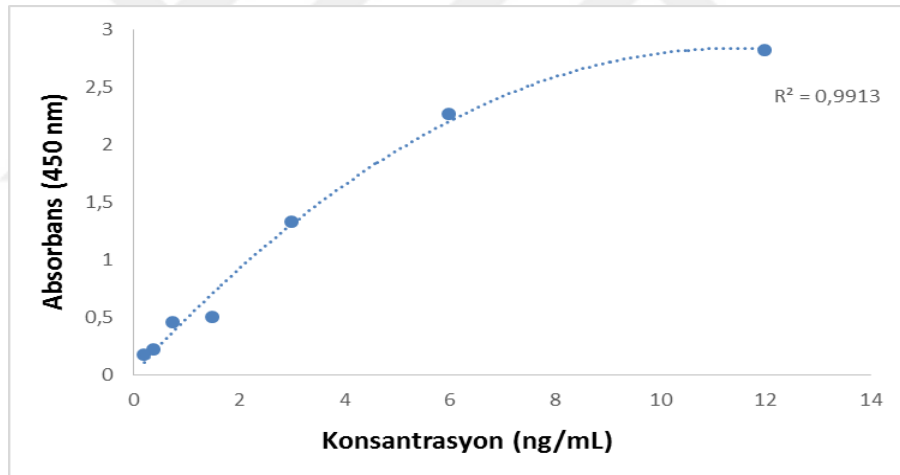
Doku örneklerindeki OSİ seviyeleri;

$$\text{“OSİ}=[(\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L) / (TAS, } \mu\text{mol TE/L)] \times 100\text{”}$$

formülü kullanılarak hesaplandı (100).

3.5.7. Ovaryum Dokusu SOD Tayini

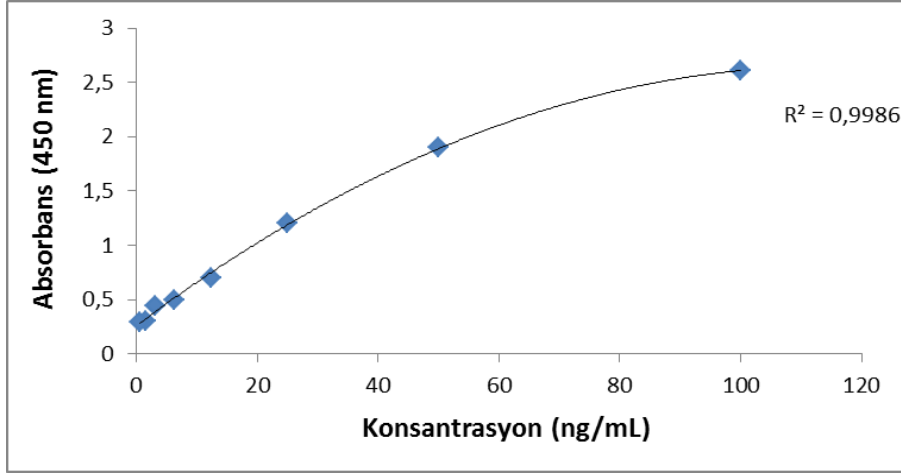
Doku örneklerinin SOD seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri ile ELISA kit (YL-Biont, Cat No: YLA0115RA, Shanghai, Çin) kullanılarak belirlendi. Sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Doku SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 16’da gösterildi.



Şekil 16. Doku SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.5.8. Ovaryum Dokusu CAT Tayini

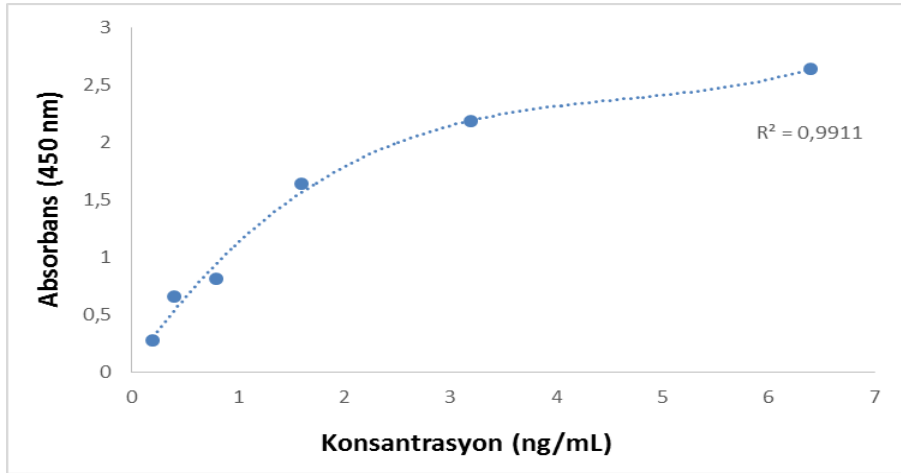
Doku örneklerinin CAT seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri ile ELISA kit (USCN, Cat No: SEC418Ra, Wuhan, Çin) kullanılarak belirlendi. Sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Doku CAT ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 17’de gösterildi.



Şekil 17. Doku CAT ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.5.9. Ovaryum Dokusu Kaspaz-3 Tayini

Doku örneklerinin kaspaz-3 seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri ile ELISA kit (YLBiont, Cat No: YLA0017RA, Shanghai, Çin) kullanılarak belirlendi. Sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Kaspaz-3 ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 18’de gösterildi.



Şekil 18. Doku kaspaz-3 ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerde verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi. Grupların karşılaştırılmasında ANOVA ve post hoc Bonferroni testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak alındı. Elde edilen veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi.



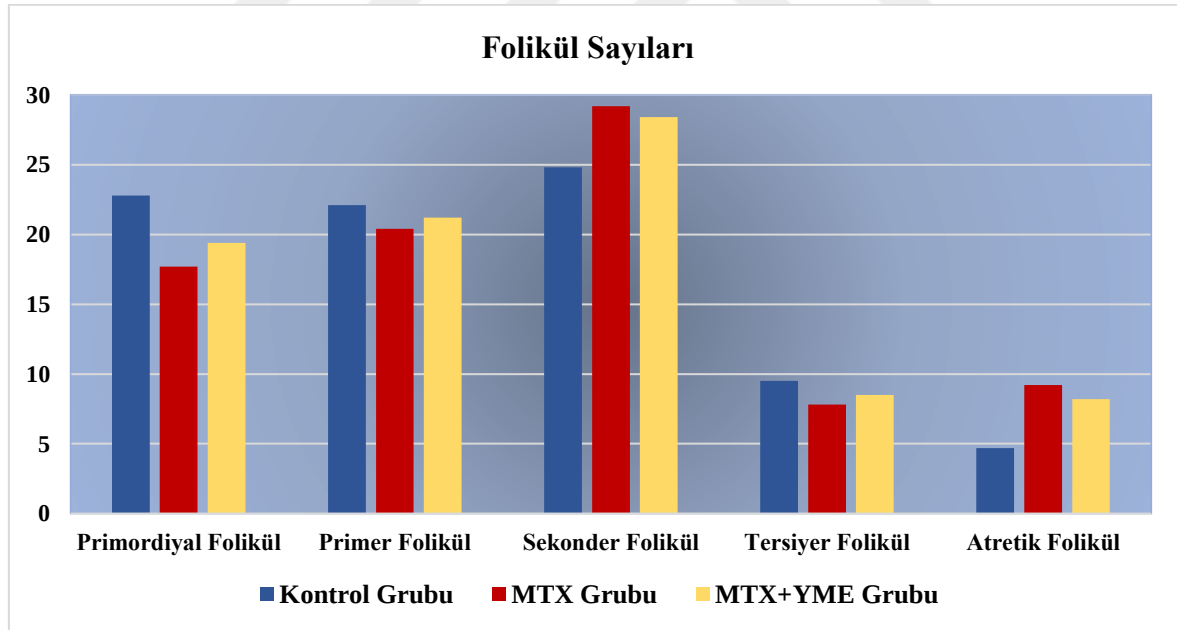
4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

Kontrol, MTX, MTX+YME gruplarına ait folikül sayısı değerlendirmeleri sağ ovarum dokularından elde edilen ve H&E ile boyanan kesitler üzerinde yapıldı.

Yapılan sayımlar sonucunda elde edilen folikül sayıları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; MTX ve MTX+YME gruplarındaki atretik folikül sayısında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış mevcuttu (sırasıyla $p=0.008$ ve $p=0.044$).

İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte primordiyal, primer ve tersiyer folikül sayılarında MTX ve MTX+YME grubunda kontrole göre azalma varken sekonder folikül sayılarında ise artış mevcuttu. MTX+YME ve MTX grubu folikül sayıları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da MTX grubunda primordiyal, primer ve tersiyer folikül sayılarının MTX+YME grubuna göre düşük; atretik ve sekonder folikül sayılarının yüksek olduğu görüldü (Şekil 19) (Tablo 8).



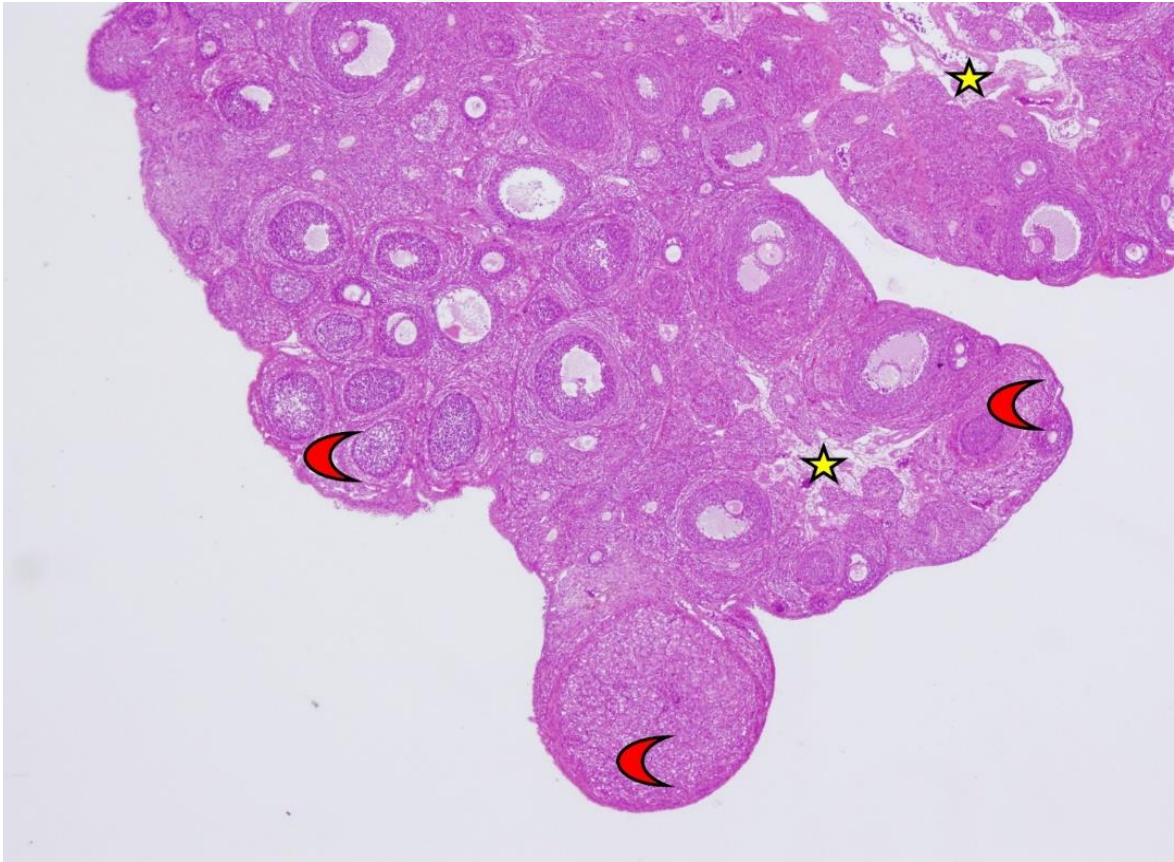
Şekil 19. Gruplara ait folikül sayılarındaki değişimlerin grafiği

Tablo 8. Folikül sayılarının gruplar arasında karşılaştırılması

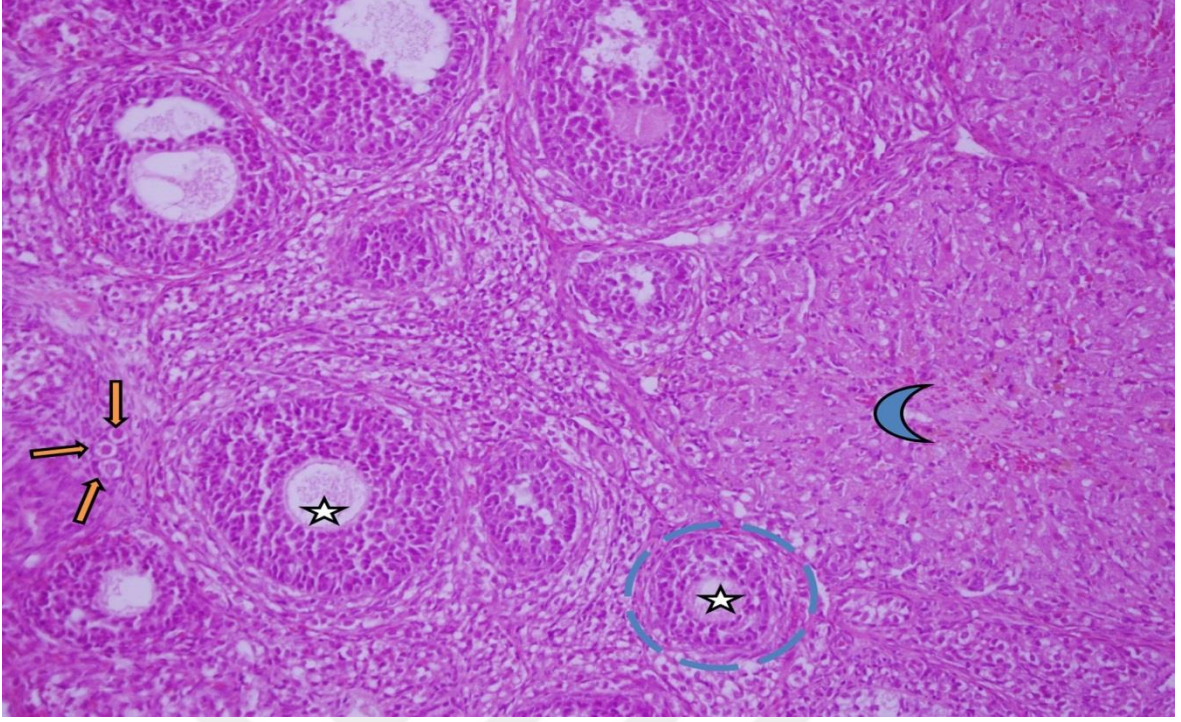
	Primordiyal Folikül Sayısı	Primer Folikül Sayısı	Sekonder Folikül Sayısı	Tersiyer Folikül Sayısı	Atretik Folikül Sayısı
Kontrol Grubu	22.85±7.60	22.14±12.26	24.85±6.74	9.571±4.577	4.71±1.88
MTX Grubu	17.71±1.79	20.42±5.31	29.28±11.96	7.857±2.672	9.28±2.87 ^A
MTX+YME Grubu	19.42±7.25	21.28±5.73	28.42±11.77	8.571±2.760	8.28±2.56 ^A

^A MTX ve MTX+YME grubu atretik folikül sayısı kontrol grubuna göre yüksekti (sırasıyla p=0.008; p=0.044)
Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi.

Kontrol grubunda; içinde perifer yerleşimli nükleus ve belirgin nükleolusa sahip maturasyonunu tamamlamamış oosit olan primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer foliküllerin ve korpus luteumun bulunduğu korteks ve kan damarlarından zengin medullaya sahip normal over dokusu izlendi (Resim 7-10).



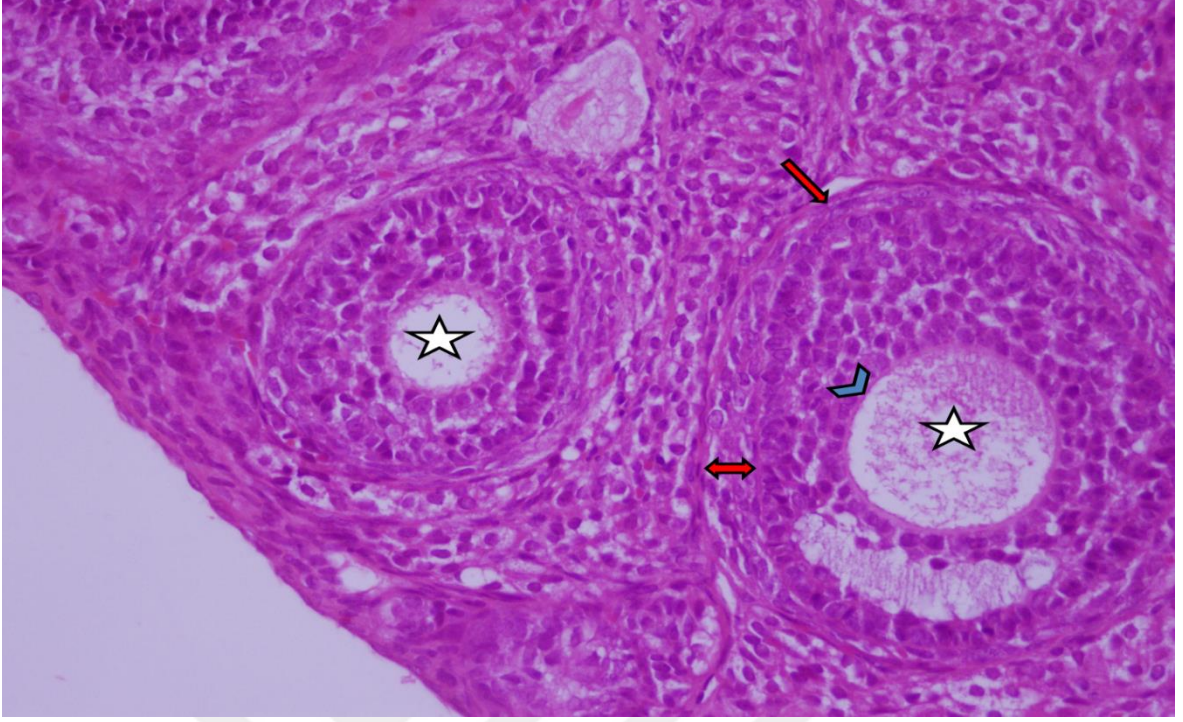
Resim 7. Kontrol grubuna ait sıçan ovaryum dokusuna ait kesitte, ovaryum medullası (sarı yıldız) ve korteksi (kırmızı ay) görülmekte (H&E x40)



Resim 8. Kontrol grubuna ait sıçan ovaryumunda korpus luteum (ay), çok katlı primer folikül (mavi çember) ve primordiyal foliküller (turuncu oklar) görülmekte. Primer foliküller içinde primer oosit (beyaz yıldız) izlenmekte (H&E x200)

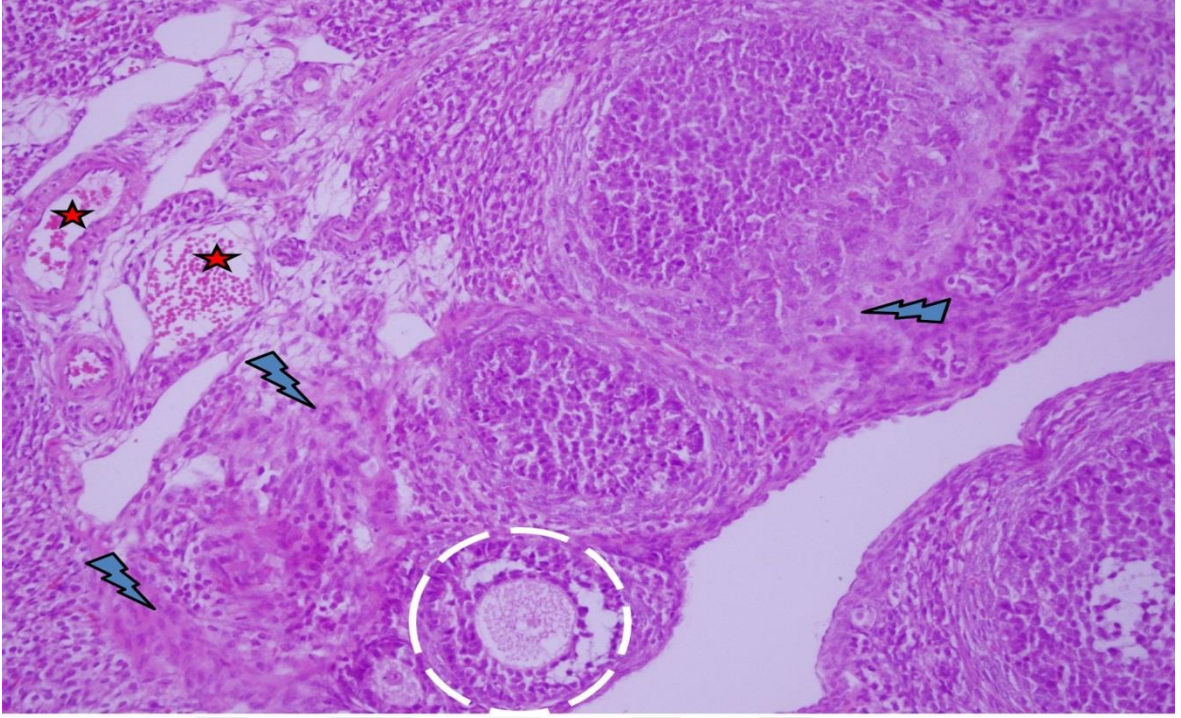


Resim 9. Kontrol grubuna ait kesitte ovaryumu saran germinal epitel tabakası (beyaz ok), folikülü çevreleyen teka eksterna (kırmızı ok), teka interna (kırmızı çift yönlü ok) tabakaları ve oositi çevreleyen ZP (mavi ok başı) ve oositin nükleusu (beyaz ok başı) görülmekte (H&E x 400)

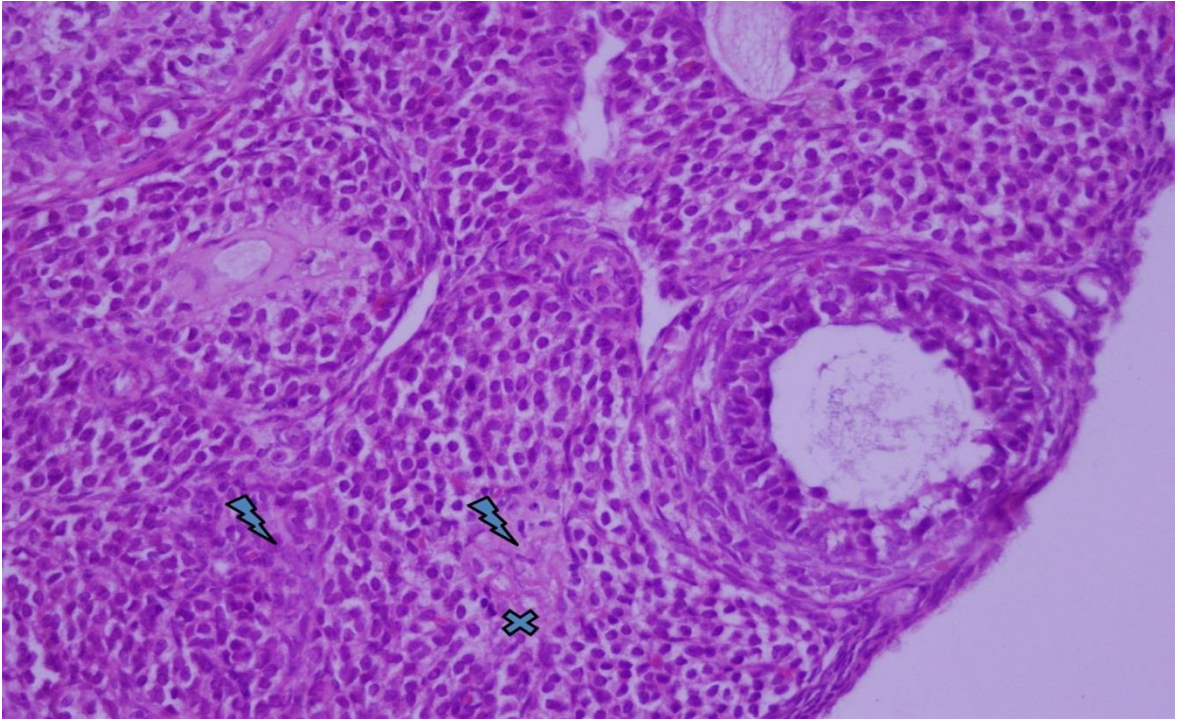


Resim 10. Kontrol grubuna ait kesitte folikülün teka eksterna (kırmızı ok), teka interna (kırmızı çift yönlü ok) tabakaları ve foliküle ait oositin (beyaz yıldız) ZP'si (mavi ok başı) görülmekte (H&E x 400)

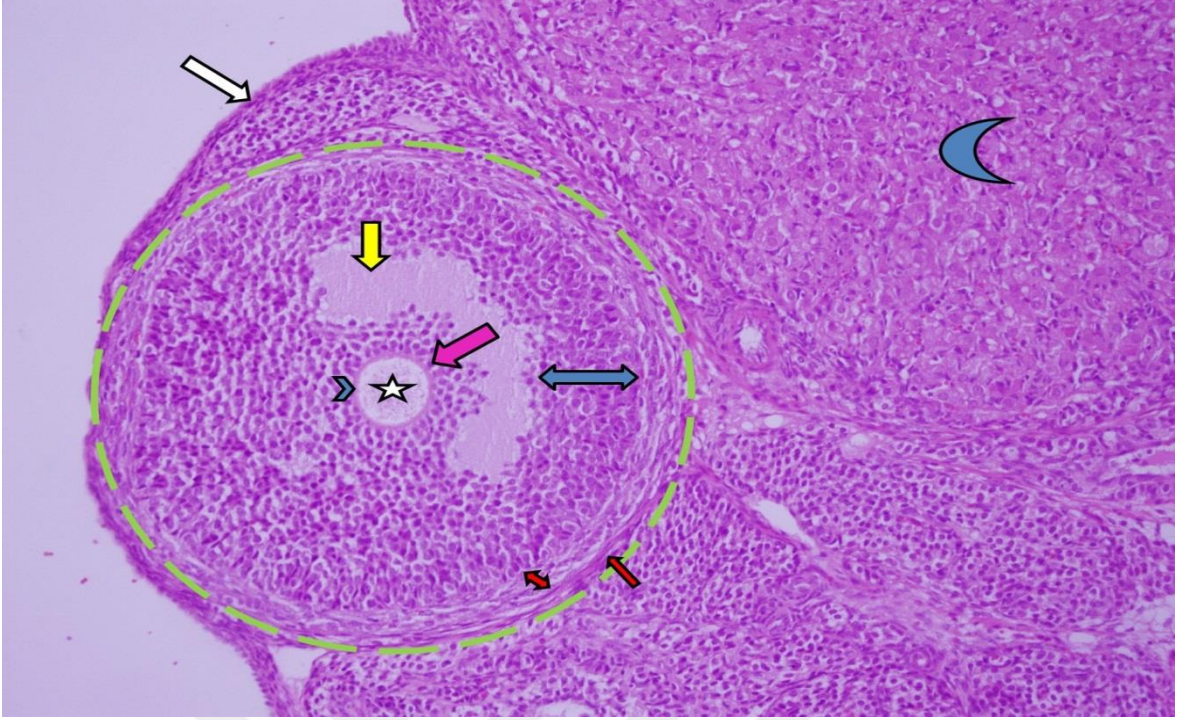
İlave olarak MTX grubuna ait H&E boyalı kesitlerde, bazı foliküllerde foliküler hücre sınırlarının kaybolduğu ve folikül içindeki oositlerin dejenere olduğu görüldü. Dokuda belirgin fokal nekroz alanları, ödem ve vazodilatasyon/konjesyon tespit edildi (Resim 11, 12). MTX grubunda görülen tüm bu patolojiler, MTX+YME grubunda belirgin olarak azalmıştı (Resim 13, 14).



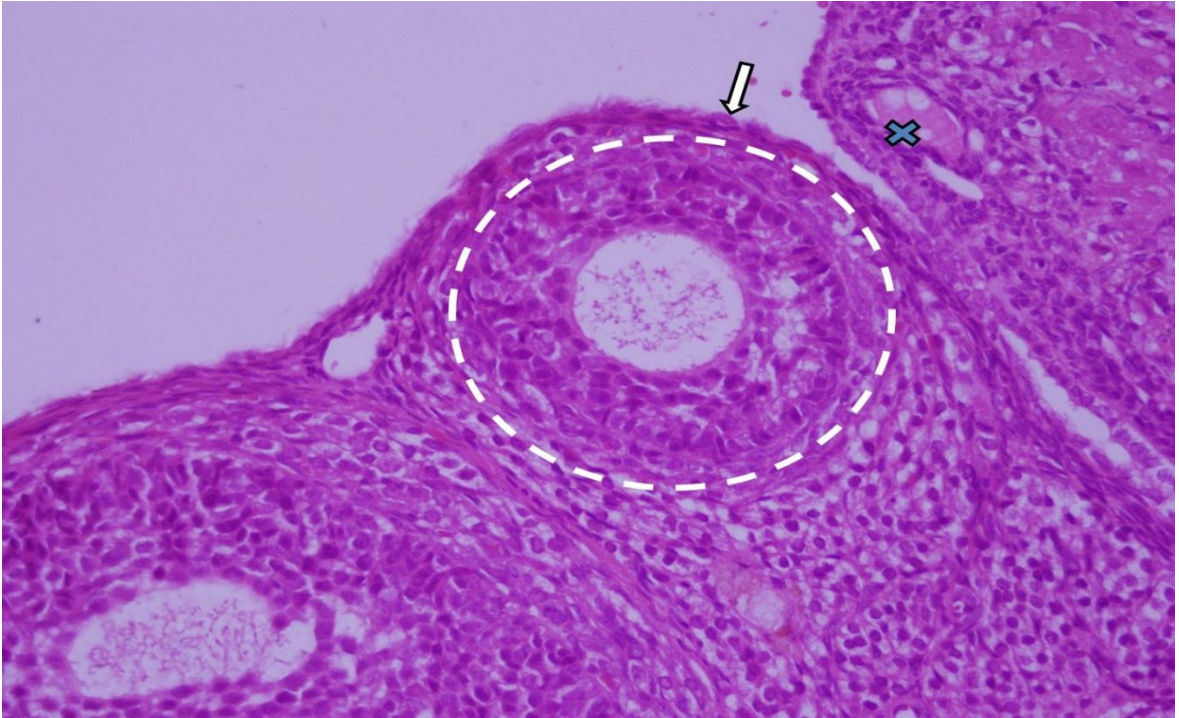
Resim 11. MTX grubuna ait kesitte görülen yoğun vazodilatasyon/konjesyon (kırmızı yıldız), folikül hücre sınırlarının kaybolduğu fokal nekroz alanları (mavi şimşek) ve bir sekonder folikül (beyaz çember) izlenmekte (H&E x 200)



Resim 12. MTX grubuna ait kesitte fokal nekroz alanları (mavi şimşek) ve ödem (mavi çarpı) izlenmekte (H&E x 400)

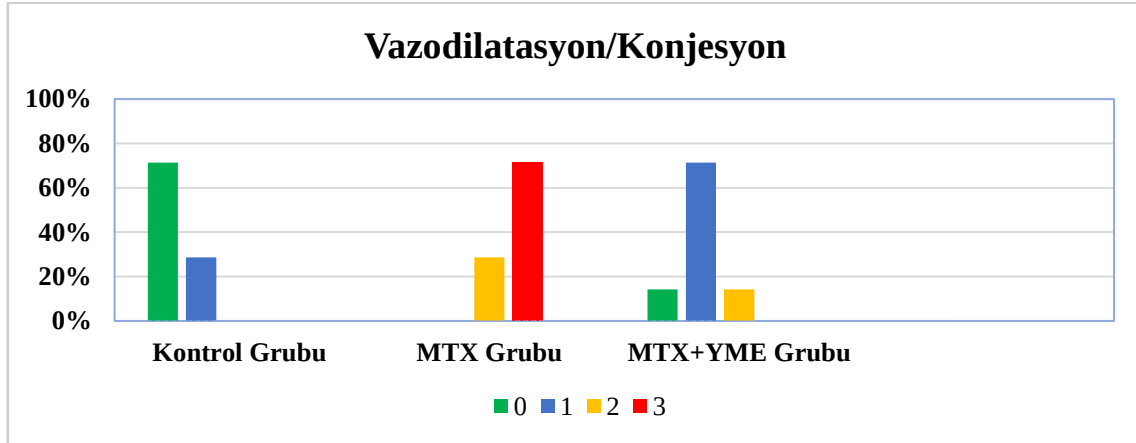


Resim 13. MTX+YME grubuna ait kesitte ovaryumun etrafını saran germinal epitel (beyaz ok) ve korpus luteum (ay) görülmekte. Tersiyer folikülde (yeşil çember), teka eksterna tabakası (kırmızı ok), teka interna tabakası (kırmızı çift yönlü ok), granüloza hücreleri (mavi çift yönlü ok), antrum (sarı ok), oosit (beyaz yıldız), ZP (mavi ok başı), korona radiata hücreleri (pembe ok) izlenmekte (H&E x200)



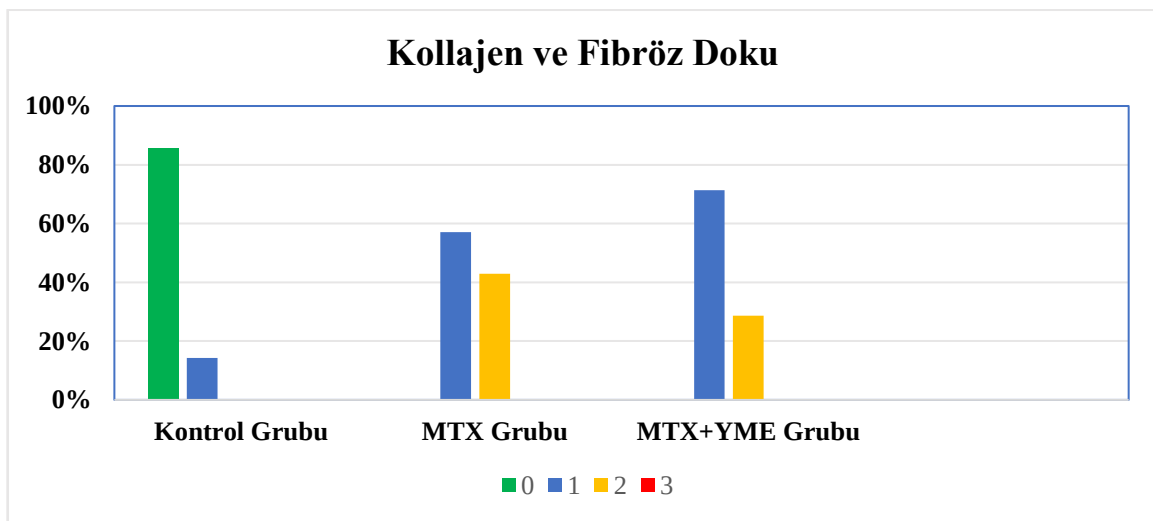
Resim 14. MTX+YME grubuna ait bir kesitte; germinal epitel tabakası (beyaz ok), sekonder folikül (beyaz çember) ve ödem (mavi çarpı) görülmekte (H&E x 400)

Gruplara ait H&E boyalı kesitlerde görülen vazokonjesyon 0-3 arasında semikantitatif olarak sınıflandığında hem MTX hem de MTX+YME grubunda kontrol grubuna göre belirgin vazodilatasyon/konjesyon görüldüğü; MTX+YME grubunda ise vazodilatasyon/konjesyonun MTX grubuna göre azaldığı gözlemlendi (Şekil 20).

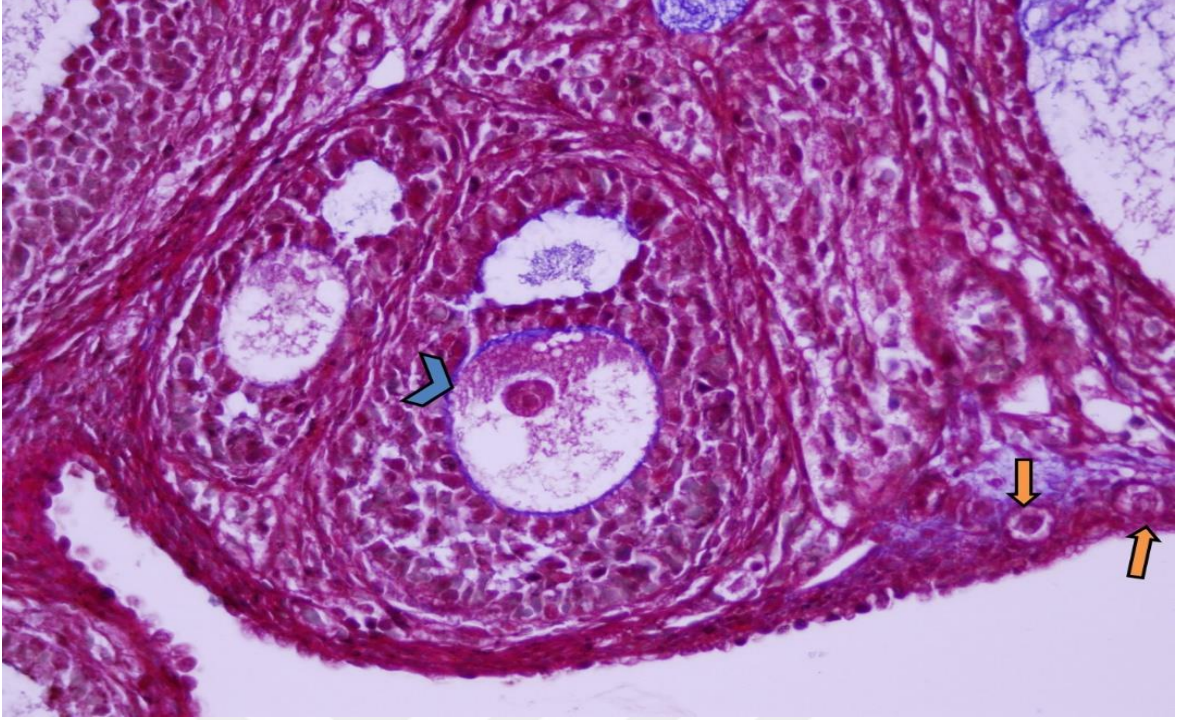


Şekil 20. Gruplara ait dokulardaki vazodilatasyon/konjesyon skorları

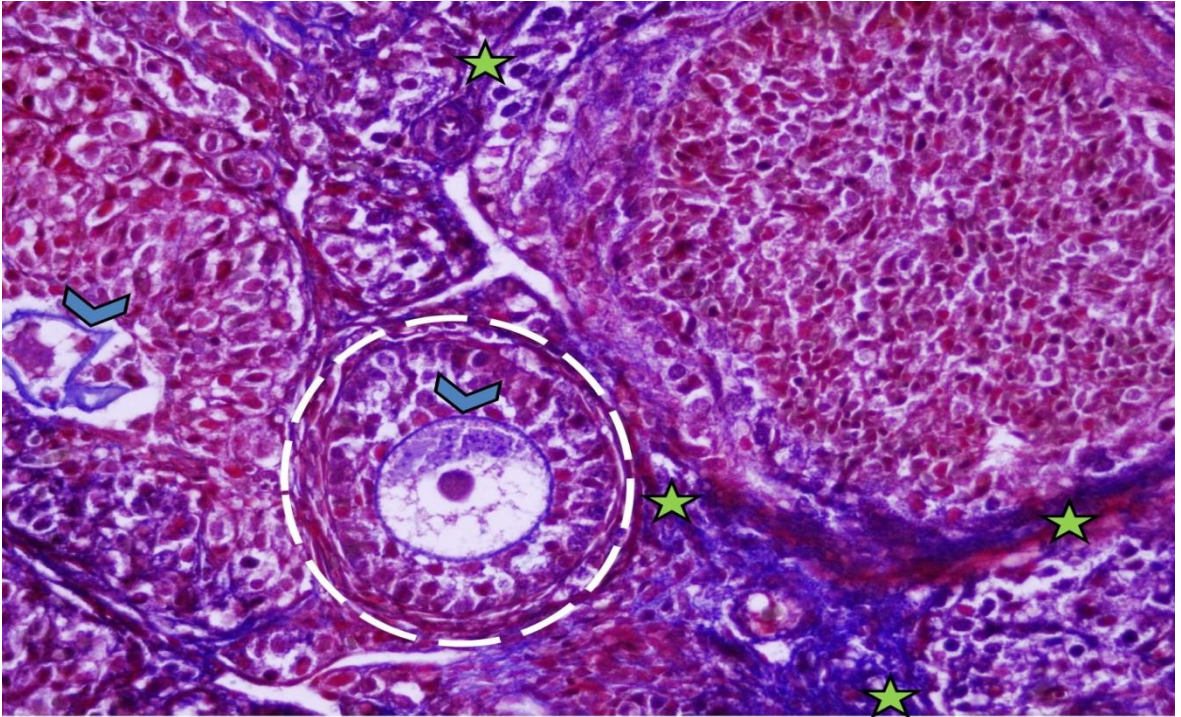
Masson Trikrom ile boyanan preparatlarda; dokulardaki fibröz doku ve kollajen artışı 0-3 arasında semikantitatif olarak skorlandı. Gruplardan hem MTX hem de MTX+YME’de kontrole göre belirgin fibröz doku ve kollajen artışı mevcuttu. Bu fibröz doku ve kollajen artışı; MTX+YME grubunda MTX grubuna göre azaldı (Şekil 21) (Resim 15-17).



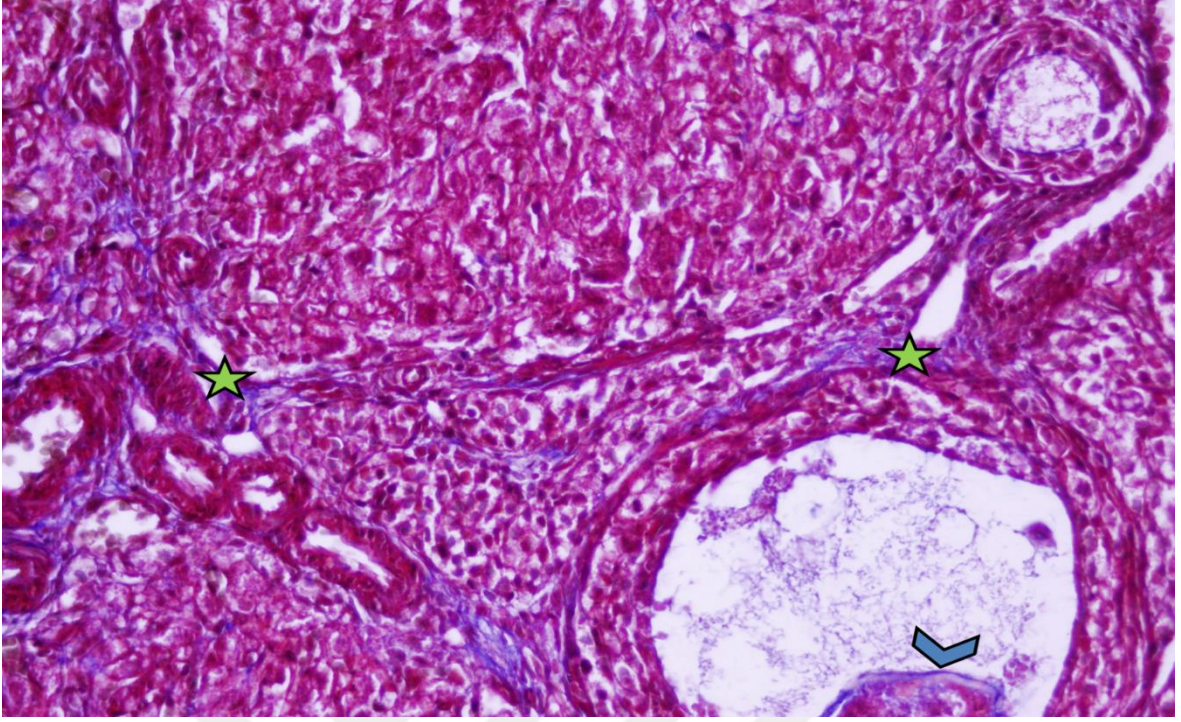
Şekil 21. Gruplara ait dokulardaki kollajen ve fibröz doku skorları



Resim 15. Kontrol grubuna ait bir kesitte primordiyal foliküller (turuncu ok) görülmekte. Sekonder folikül içindeki oositi çevreleyen düzenli mavi renkte ZP (mavi ok başı) görülmekte (Masson Trikrom, x 400)



Resim 16. MTX grubuna ait kesitte, dejenere olmuş bir oositten geride kalan düzensiz ve sekonder foliküldeki (beyaz çember) oositi çevreleyen düzenli mavi boyanan ZP (mavi ok başı) izlenmekte. Yoğun mavi boyalı kollajen ve fibroz doku (yeşil yıldız) artışı olduğu görülmekte (Masson Trikrom, x 400)



Resim 17. MTX+YME grubuna ait kesitte düzensiz mavi boyanan ZP (mavi ok başı) ve kollajen ve fibröz doku (yeşil yıldız) artışının azaldığı görülmekte (Masson Trikom, x 400)

4.2. Ovaryum Dokularının Biyokimyasal Bulguları

Doku biyokimyasal değerlendirmeleri için sıçanların sol ovaryumları kullanıldı. MTX grubunda MDA değeri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p=0.042$) (Tablo 9). Kontrol grubu ile MTX+YME grubu arasında MDA değerleri açısından istatistiksel fark yoktu ve MTX+YME grubu MDA değerleri istatistiksel olarak fark oluşturmaya da MTX'e göre düşüktü. Benzer şekilde MTX grubunda 8-OHdG değerleri de kontrol ve MTX+YME gruplarına göre yüksekti ancak bu yükseklik istatistiksel anlamlı değildi.

Doku CAT ve SOD gibi antioksidan enzim ve TAS seviyeleri; MTX grubunda kontrole ve MTX+YME'ye göre belirgin olarak düşüktü ancak istatistiksel anlam bulunamadı. İlave olarak MTX grubuna ait ovaryum dokularının TOS, OSI ve Kaspaz-3 seviyelerinde de; kontrol ve MTX+YME gruplarına göre istatistiksel anlamlı olmayan artış tespit edildi (Tablo 9).

Tablo 9. Ovaryum dokularının biyokimyasal bulguları

	Kontrol Grubu	MTX Grubu	MTX+YME Grubu
MDA	43.34±9.87	68.00±22.47 ^A	44.72±16.18
8-OHdG	0.76±0.23	2.23±1.99	1.361±1.44
CAT	101.20±30.39	73.35±19.87	87.51±23.76
SOD	7.38±9.34	2.25±0.89	4.28±1.87
TAS	0.13±0.04	0.09±0.06	0.13±0.10
TOS	16.61±8.26	25.78±14.08	22.54±9.13
OSİ	16.70±14.79	105.74±183.96	69.50±109.27
Kaspaz-3	0.61±0.15	2.04±1.95	0.86±0.57

A MTX grubunun MDA düzeyi kontrol grubuna göre arttı. (p=0.042).
Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi.

5. TARTIŞMA

Dünyadaki ölüm sebeplerinin başında gelen ve en önemli halk sağlığı problemlerinden olan kanser tedavisi için yapılan uygulamalar; bir yandan kanseri tedavi ederken diğer yandan organizmadaki farklı sağlıklı sistemler üzerinde yüksek toksik etkiler oluşturabilir. Uygulanan kemoterapi ve radyoterapi gibi tedaviler; hem dişi hem de erkekte üreme sisteminin bir parçası olan gonadlar üzerine toksik etki gösterebilirler (101, 102). Özellikle kadınlarda radyoterapi ve/veya kemoterapi nedeniyle hasar gören gonadlar; prematür ovaryan yetmezliğe, prematür menapoza ve infertiliteye neden olabilir (101, 103, 104).

Hem kanser tedavisinde hem de otoimmün bazı hastalıkların tedavisinde tek başına veya diğer kemoterapötiklerle kombine olarak kullanılan MTX'in de hem üreme hem de diğer sistemler üzerinde olumsuz etkileri mevcuttur (105-107) Bu olumsuz etkilerin kökeninde; MTX'in serbest radikal üretimini artırması ve dokularda oksidatif strese yol açması olabilir (108). İlave olarak MTX, antioksidan enzim sisteminin çalışmasını da bozabilir (109).

Dokularda hasara neden olabilen oksidatif stres; günümüzde diyabet, koroner arter hastalığı ve kanser gibi pek çok hastalığın etiyolojisinden sorumlu tutulmaktadır. Organizmada bulunan antioksidan enzimleri de içeren endojen antioksidan sistem ve buna ilave olarak meyve-sebzelerden alınan flavonoid, karotenoid ve C vitamini gibi eksojen antioksidanlar; serbest radikaller ve oksidatif stresle savaşmaktadır (1, 66).

Günümüzde kemoterapötik ilaçların toksik etkilerini azaltmak için farklı antioksidanların denendiği birçok çalışma yapılmıştır (11, 105, 107, 110). Yaban mersini de serbest radikal temizleyicisi görevi üstlenerek serbest radikallerin dokulara zarar vermesini önleyebilen güçlü antioksidan özelliklere sahip bir meyvedir (90, 111). Yaban mersininde bulunan antosiyaninler, flavonoidler ve diğer fenolik bileşiklerin; antioksidan, antimutagenik, antikanserojenik, antienflamatuar, antihipertansif, antihiperlipidemik, antiproliferatif ve antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir (15).

Bu nedenlerle biz de çalışmamızda; dokularda oksidatif strese yol açan kemoterapötik bir ajan olan MTX kaynaklı ovaryum hasarına karşı; antioksidan özelliğe sahip yaban mersini meyvesinin etkilerini inceledik.

Oksidatif stres, serbest radikal üretimi ve antioksidan savunma sistemlerinin arasında bulunan hassas dengede bir bozulma durumunda ortaya çıkar (1, 112). Bugüne kadar birçok

çalışmada, MTX'in farklı organlarda oksidatif stres kaynaklı olduğu düşünülen hasarlar yaptığı bildirilmiştir (106, 108, 110, 113). Bu çalışmalardan birinde Asci ve ark. (114); gallik asitin MTX ile indüklenmiş böbrek hasarına etkilerini araştırmışlar ve çalışmalarının MTX grubunda oksidatif stresin gösterilmesinde etkin belirteçler olan TOS ve OSI değerlerinin artarken TAS değerinin azaldığını rapor etmişlerdir. Bunun aksine MTX'le birlikte gallik asit verilen grupta MTX grubuna göre TOS, OSI değerlerinin düşük ve TAS değerlerinin yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bir başka çalışmada Savran ve ark. (106); MTX uygulanan grubun MDA düzeyinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu ve SOD, CAT ve GPx düzeylerinin ise daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. İlave olarak MTX ile birlikte antioksidan olarak C vitamini verilen grupta ise MTX etkilerinin düzelerek MDA düzeyinin düştüğünü ve SOD, CAT ve GPx düzeylerinin ise arttığını gözlemlemişlerdir. Molsidominin MTX kaynaklı karaciğer hasarına karşı koruyucu etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise; MTX uygulanan grupta MDA seviyesinin artmış, SOD ve CAT seviyelerinin azalmış olduğu bildirilmiştir (113). İlave olarak Abdel-Raheem ve Khedr (115)'in sıçanlarda MTX kaynaklı böbrek hasarına karşı montelukastın koruyucu etkilerini araştırdıkları bir başka çalışmada; MTX grubu MDA seviyesinin kontrole göre arttığı, SOD seviyesinin ise azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmalardan başka iki çalışmada da böbrek dokularında MTX'in yukardaki çalışmalara ve bizim çalışmamıza benzer şekilde doku MDA seviyesinde yükselmeye neden olduğu bildirilmiştir (116, 117). Yulug ve ark. (105) da sıçan bağırsağında MTX'e bağlı hasarın önlenmesinde bilinen bir antioksidan olan resveratrolün etkinliğini araştırdıkları çalışmada; MTX grubunda MDA seviyesinin yükseldiğini, SOD seviyesinin azaldığını ve resveratrolün ise MTX'in bu olumsuz etkilerini kompanse ettiğini gözlemlemişlerdir. Ata ve ark. (7) ise MTX kaynaklı ovaryum hasarına karşı resveratrolün etkilerini inceledikleri çalışmalarında MTX grubu ovaryum dokusunda MDA'nın kontrole göre yüksek, SOD ve GSH'ın düşük olduğunu ve MTX+Resveratrol grubunda ise değerlerin kontrole benzer olduğunu bildirmişlerdir. MTX kaynaklı ovaryum hasarına oksitosinin etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada da MTX'in kontrol grubuna kıyasla plazma MDA seviyelerinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir (118). Yapca ve ark. (119) da MTX kaynaklı dişi üreme sistemindeki oksidatif hasara karşı mirtazapinin etkilerini inceledikleri çalışmalarında, MTX verilen gruptaki ovaryum doku MDA seviyesinin kontrol grubu ve Mirtazapin+MTX grubuna göre artmış olduğunu bildirmişlerdir. Pandir ve ark. (111, 120) ise sisplatinine bağlı eritrosit ve ovaryum hasarına karşı yaban mersininin etkilerini inceledikleri iki farklı çalışmada; bir kemoterapötik olan sisplatinin kontrol grubuna göre doku MDA seviyelerinde artışa ve

antioksidan enzim seviyelerinde düşüşe neden olduğunu bildirmişlerdir. İlave olarak; sisp-latine ek olarak YME verilen gruplarda ise YME'nin antioksidan etkisi ile doku MDA seviyelerinde düşüşe ve antioksidan enzim seviyelerinde artışa neden olduğunu ortaya koymuş-lardır.

Bu çalışmaların sonuçlarına benzer şekilde biz de, çalışmamızda kemoterapötik ola-rak MTX verdiğimiz grup ovaryum dokularında, lipid peroksidasyon belirteci olan MDA seviyelerinin kontrole göre artmış olduğunu gözlemledik. Çalışmamızda MTX grubunda tes-pit edilen belirgin MDA artışının; ROT'un aşırı birikimiyle oluşan oksidatif stresin dokuya verdiği hasara bağlı olabileceğini düşündük (7, 105). Asci ve ark. (114)'nın çalışmasına ben-zer şekilde biz de çalışmamızda, MTX grubuna ait doku TOS ve OSİ değerlerinde artış, TAS değerinde düşüş gördük ancak istatistiksel fark bulamadık. İlave olarak bahsedilen çalışma-ların MTX grubunda görülen antioksidan enzim seviyelerindeki düşüşe benzer şekilde, bi-zim MTX grubunda da diğer gruplara göre antioksidan enzimlerden CAT ve SOD seviyele-rinde istatistiksel anlamlı olmasa da bir düşüş mevcuttu. Bu düşüşün, MTX'in antioksidan sistem üzerine muhtemel baskılayıcı etkilerine bağlı olabileceğini düşündük (109, 11).

Çalışmamızda, MDA seviyeleri bakımından MTX+YME grubu ile kontrol grubu arasında fark yoktu. İlave olarak istatistiksel fark yaratmasa da MTX+YME grubu MDA değerleri MTX grubuna göre oldukça düşüktü. Bu durumu; MTX'in özellikle hücre lipidleri üzerinde oluşturduğu oksidatif stresin YME tarafından kompanse edilmiş olabileceği şek-linde yorumladık (90, 120). MTX grubuna göre MTX+YME grubu SOD ve CAT düzeyle-rinin ise, istatistiksel anlamlı olmasada, literatürde yer alan ve aralarında YME'nin de bu-lunduğu farklı antioksidanların kullanıldığı çalışmalara benzer şekilde arttığını belirledik (7, 105, 106, 120). Bu etkinin, yaban mersini meyvesinde bulunan flavanoidler ve antosiyanin-ler gibi pek çok bileşiğin antioksidan özelliklerinden kaynaklanmış olabileceğini düşündük.

İlave olarak MTX+YME grubunda; istatistiksel anlamlı olmasa da TOS ve OSİ de-ğerlerinin MTX grubuna göre azaldığını, TAS'ın ise antioksidan olarak gallik asitin kulla-nıldığı çalışmaya benzer şekilde arttığını belirledik (114). Bu da bize; MTX ile beraber ver-diğimiz YME'nin; diğer çalışmalarda kullanılan C vitamini ve resveratrol gibi antioksidan-lara benzer şekilde davranarak oksidatif stres belirteçlerinin azalıp antioksidan parametrele-rin artışıını indüklemiş olabileceğini düşündürdü (7, 106).

Serbest radikaller ileri derecede saldırgan bileşiklerdir ve ROT'un da dahil olduğu bu bileşiklerin aşırı birikimi, lipidlerin ve proteinlerin yanında hücrede DNA hasarına da

sebepler olabilir (65, 67, 112). Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasar sonucunda DNA zincirinde bozulmalar biyokimyasal olarak 8-OHdG seviyelerinin ölçümü ile ortaya konabilir (67, 73). Arslan A ve ark. (121) yapmış oldukları çalışmada; MTX grubu sıçan bağırsak dokularında oksidatif stres parametrelerinden MDA, myeloperoksidaz ve 8-OHdG'in de artmışken antioksidan parametrelerden GSH seviyelerinde düşüş olduğunu bildirdiler. Resveratrol ve famotidinin ise oksidatif stres parametrelerindeki artışı ve GSH seviyelerindeki düşüşü engellediğini rapor ettiler. Biz de çalışmamızda, literatüre benzer şekilde MTX grubunda 8-OHdG seviyelerinin istatistiksel anlamlı olmasa da kontrole göre arttığını belirledik. MTX+YME grubunda ise 8-OHdG seviyeleri, MTX grubuna göre düşüktü ancak bu fark istatistiksel anlam oluşturmadi.

Oksidatif stresin; hücre zarı lipidlerine, proteinlerine ve DNA'sına verdiği zararlar hücreyi apoptoza sürükleyebilir (122). Literatürde günümüze değin pek çok hücre ölümü çeşidi tanımlanmıştır ve apoptoz da bunlardan biridir. Apoptoz, ışık mikroskopik olarak ve hücrede oluşan DNA kırıklarının çeşitli yöntemlerle tespiti ile bir diğer hücre ölümü çeşidi olan nekrozdan kolayca ayırt edilebilen programlanmış hücre ölümüdür (123). Apoptoz; kaspaz adı verilen sistein aspartik proteazların seri aktivasyonu ile oluşur. Kaspaz-3 gibi kaspazlardaki artışın biyokimyasal olarak tespiti, dokuda apoptoz göstergelerinden biridir (124).

Literatürde MTX'in dokularda apoptozu indüklediği ile ilişkili çok sayıda çalışma mevcuttur. Ekinci Akdemir ve ark. (125), MTX'in karaciğer dokusunda toksik etkiye sebep olarak 8-OHdG ve kaspaz-3 miktarlarını arttırdığını göstermişlerdir. Owumi ve ark. (126) ise MTX tedavisi uygulanan sıçanların hem karaciğer hem de böbreklerinde kaspaz-3 aktivitesinde artış olduğunu göstermiştir. Bir başka çalışmada MTX' in ovaryum dokusunda neden olduğu oksidatif stresin foliküllerde apoptoza sebep olduğu TUNEL yöntemi ile gösterilmiştir (110). Biz de çalışmamızda MTX grubu ovaryum dokusunda, apoptozu gösteren kaspaz-3 değerlerinde literatürle uyumlu artış ve MTX+YME verilen grupta düşüş olduğunu tespit ettik. Ancak veriler istatistiksel fark oluşturmadi ve bu da bize kaspaz-3 ölçümü yanında TUNEL gibi ek bir yöntemle dokuda apoptoz tayini yapamamış olmamızın çalışmamızın eksik yönü olabileceğini düşündürdü.

Hücrelerde apoptoza yol açabilen MTX, dokularda ışık mikroskopik olarak da gösterilebilen patolojik değişikliklere neden olabilir. Literatürdeki çalışmalar; böbrek doku-

sunda MTX'in, glomerüllerde bozulmalar ve atrofi, epitel hücrelerinde dejenerasyon, tübüler hücre nekrozu, dokuda hemoraji ve intersitisyel ödem ve nekroz gibi patolojilere neden olduğunu bildirmektedir (111, 114-117, 127). Karaciğer dokusunda ise MTX'in; nekroz ve dejenerasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon ve dilatasyon ve hepatositlerde piknotik çekirdekler gibi olumsuz değişikliklere neden olabileceği gösterilmiştir (106, 125). Testis dokusunda da MTX, interstisyel alanda ödem, lümende olgunlaşmamış germ hücreleri, seminifer tübül çapında ve germinal epitel kalınlığında azalma gibi patolojilere yol açmaktadır (128, 129). Biz de çalışmamızda, MTX'in farklı organlarda yaptığı hasarları gösteren bu çalışmalara benzer şekilde, over dokusunda da hasara neden olduğunu belirledik.

Turkler ve ark. (107) yaptıkları çalışmada, MTX'in over dokusunda foliküler hücreler ve interstisyel alanda ödem, vasküler dilatasyon ve konjesyon ve ilave olarak inflamatuvar hücre infiltrasyonuna neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Biz de MTX grubumuzda; Turkler ve ark. (107) çalışmasına benzer şekilde vazodilatasyon/konjesyon ve interstisyel alanda ödem tespit ettik. İlave olarak kortekste bazı follikülerde hücre sınırlarının kaybolduğunu, fokal nekroz alanları oluştuğunu gördük. Shohda ve ark. (6) çalışmasında bildirdiklerine benzer şekilde MTX grubunda bazı foliküllerin atreziye uğradığını ve oositlerin dejenere olduğunu gördük. İlave olarak çalışmamızda; antioksidan olarak Turkler ve ark. (107)'nin kullandıkları likopen ve Shohda ve ark. (6) kullandıkları folik asite benzer şekilde YME'nin MTX'in yol açtığı tüm bu olumsuz etkileri azalttığını tespit ettik. İlave olarak Pandir ve ark. (120)'nin sisplatinle oluşturdukları over hasarını hafifletebildiğini gösterdikleri YME'nin; MTX'le indüklenen over hasarını da benzer şekilde azaltabildiğini gösterdik. Hortu ve ark. (118), MTX'in over dokusunda fibrozis yapabildiğini göstermişlerdir; benzer şekilde bizim MTX grubumuzda da kollajen ve fibröz doku artışı mevcuttu. Antioksidan özelliklere sahip Koenzim Q10 ve dut ekstraktı kullanılan çalışmalardakine benzer şekilde YME'nin dokudaki MTX'e bağlı fibrozisi ve aşırı kollajen birikimini azaltabildiğini gördük ve bunun YME kaynaklı antioksidan etkiye bağlı olabileceğini düşündük (130, 131).

Kemoterapötik ilaçların kullanımı; overlerdeki oositlere, foliküllere, stromal hücrelere ve vasküler yapıya geri dönüşümsüz zararlar vererek infertiliteye neden olabilir. (46). Taskin ve ark. (132), kemoterapötik olarak sisplatin uyguladıkları grupta primordiyal, sekonder ve tersiyer foliküllerin kontrol grubuna göre azaldığını tespit etmişlerdir. Gol ve ark.

(133) da yüksek doz MTX uyguladıkları grupta, primordiyal folikül sayısının azaldığını bildirmişlerdir. Ulug ve Oner (99), ise tek yüksek doz MTX uygulamasının sadece primer, sekonder ve total folikül sayısında; 1., 3., 5. ve 7. günlerde çoklu düşük doz MTX uygulamasının ise primordiyal, primer, sekonder, tersiyer ve total folikül sayılarında istatistiksel anlamlı azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da MTX grubunda her ne kadar literatüre benzer şekilde primordiyal, primer, tersiyer folikül sayılarında düşüş olsa da istatistiksel fark oluşturmadi. Bu durumun çalışmamızın denek sayısının diğer çalışmalara göre düşük olması ile ilişkili olabileceğini düşündük. Çalışmamızın MTX+YME grubunda primordiyal, primer ve tersiyer folikül sayılarının istatistiksel fark yaratmasa da kontrole göre düşük ancak MTX'e göre yüksek olması; YME'nin oksidatif strese karşı çalışan, antioksidan iyileştirici etkilerine bağlı olabilir.

Karri ve Vanithakumari (134) yaptıkları bir çalışmada, bizim çalışmamıza benzer şekilde MTX'in over dokusunda atretik folikül sayısında artışa neden olduğunu bildirdiler. Çalışmamızda hem MTX hem de MTX+YME grubunda atretik folikül sayısının kontrole göre yüksekti. Foliküllerdeki atrezi artışına, MTX'in hızlı bölünen granüloza hücrelerinde hasara ve bu hücrelerin sentezledikleri steroid hormonlarda yetersizliğe yol açması olabileceğini düşündük (134).

Sonuç olarak çalışmamızdaki veriler ışığında; MTX'in over dokusunda başlıca MDA artışı ile temsil edilen oksidatif hasara, foliküllerde atreziye ve histopatolojik hasara neden olduğu ve oluşan bu hasarın uzun vadede over dokusunu harap edebileceğini düşündük. İlave olarak YME kullanımının, overdeki MTX kaynaklı olumsuz etkileri azalttığını ancak etkin doz ve sürenin tespiti için denek sayısının artırıldığı ilave çalışmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dişi erişkin sıçanlarda MTX kaynaklı ovaryum hasarına karşı YME'nin koruyucu etkilerini incelediğimiz bu deneysel çalışmamızda;

MTX uygulaması over dokusunda;

1. Oksidatif stres göstergesi olan MDA değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı yükselişe neden oldu.
2. Oksidatif stres göstergesi olan 8-OHdG, TOS ve OSİ değerlerinde yükselmeye neden oldu ancak bu artış istatistiksel fark oluşturmadi.
3. Antioksidan enzimlerden CAT ve SOD seviyelerinde istatistiksel fark göstermeyen düşüşe neden oldu.
4. Apoptoz göstergesi olan kaspaz-3 seviyelerinde istatistiksel anlamlı olmayan artışa neden oldu.
5. Atretik folikül sayısında istatistiksel anlamlı bir artışa neden oldu.
6. Fokal nekroz alanları, ödem ve vazodilatasyon/konjesyon oluşmasına ve foliküler hücre ve oositlerde dejenerasyona neden oldu.
7. Kollajen ve fibroz doku artışına neden oldu.

MTX'e ilave olarak YME uygulaması over dokusunda;

1. MTX'in artışına neden olduğu MDA seviyelerini düşürdü ve kontrol grubuna yaklaştırdı.
2. MTX'in artışına neden olduğu 8-OHdG, TOS ve OSİ değerlerinde istatistiksel fark yaratmayan düşüşe neden oldu.
3. MTX'in düşürdüğü CAT ve SOD seviyelerinde istatistiksel fark göstermeyen artışa neden oldu.
4. MTX'in artırdığı kaspaz-3 seviyelerinde istatistiksel anlamlı olmayan düşüşe neden oldu.
5. MTX'in artırdığı atretik folikül sayısında istatistiksel anlamlı olmayan düşüşe neden oldu.
6. MTX'in oluşturduğu fokal nekroz alanları, ödem, vazodilatasyon/konjesyonda ve oosit dejenerasyonunda belirgin azalmaya neden oldu.
7. MTX'in indüklediği kollajen ve fibröz doku artışını azalttı.

Çalışmamızın sonuçları doğrultusunda yapılacak diğer çalışmalarda;

1. MTX'in ovaryum dokusunda oluşturduğu hasarı azaltan YME'nin, dokudaki hasarı tamamen yok etmek veya önlemek için kullanılacak etkin süre/dozunun tam olarak belirlenebilmesi için farklı doz ve sürelerdeki etkileri araştırılabilir.
2. YME'nin ovaryum dokusundaki oksidatif strese karşı moleküler düzeydeki etkilerini belirlemek için moleküler biyolojiden de faydalanılabilir.
3. Foliküllerde oluşan apoptozun daha etkin belirlenebilmesi için dokuda kaspaz 3 bakılması yanında TUNEL yöntemi veya flow sitometri gibi ek yöntemler de kullanılabilir.
4. Histolojik yönden değerli bir parametre olan ve mikro yapılar hakkında daha ayrıntılı bilgi verebilen elektron mikroskopik inceleme de kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Rahman K (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging* 2: 219–236.
2. Grigalius I, Petrikaite V (2017). Relationship between antioxidant and anticancer activity of trihydroxyflavones. *Molecules* 22(12): 2169.
3. Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N (2012). How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod Update* 18: 525–535.
4. Soyman Z, Uzun H, Bayindir N, Esrefoglu M, Boran B (2018). Can ebselen prevent cisplatin-induced ovarian damage? *Arch Gynecol Obstet* 297: 1549-1555.
5. Altuner D, Gulaboglu M, Yapca OE, Cetin N (2013). The effect of mirtazapine on cisplatin-induced oxidative damage and infertility in rat ovaries. *Scientific World Journal* 2013: 1–6. doi:10.1155/2013/327240.
6. Shohda AA, El-banna AK, Abdel Fattah FM (2017). The possible protective effect of folic acid against Methotrexate induced ovarian damage in female albino rats. « Light and electron microscopic study». *BNNI* 49: 1-24.
7. Ata N, Kulhan NG, Kulhan M, Turkler C, Kiremitli T, Kiremitli S, Keskin Cimen F, Suleyman H, Toprak V (2019). The effect of resveratrol on oxidative ovary-damage induced by Methotrexate in rats (Resveratrol oxidative ovary-damage). *Gen Physiol Biophys* 38: 519–524.
8. Widemann BC, Adamson PC (2006). Understanding and managing Methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* 11: 694–703.
9. Uraz S, Tahan V, Aygun C, Eren F, Unluguzel G, Yüksel M, Senturk O, Avsar E, Haklar G, Celikel C, Hulagu S, Tozun N (2008). Role of ursodeoxycholic acid in prevention of Methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci* 53: 1071–1077.
10. Visentin M, Zhao R, Goldman ID (2012). The antifolates. *Hematol Oncol Clin North Am* 26: 629–648.
11. Soylu Karapinar O, Pinar N, Özcan O, Özgür T, Dolapçioğlu K (2017). Protective effect of alpha-lipoic acid in Methotrexate-induced ovarian oxidative injury and decreased ovarian reserve in rats. *Gynecol Endocrinol* 33: 653-659.

12. Rodgers Dinstel R, Cascio J, Koukel S (2013). The antioxidant level of Alaska's wild berries: high, higher and highest. *Int J Circumpolar Health* 72(1): 2118.
13. Savaş HB, Türkkan A, Yavuz B, Yiğit A, Uz E, Bayram NZ, Kale B (2016). The effects of *Vaccinium myrtillus* on antioxidant system and lipid peroxidation in experimental diabetic rats model. *Int J Basic Clin Med* 4: 53-9.
14. Drózdź P, Šežienė V, Pyrzynska K (2017). Phytochemical properties and antioxidant activities of extracts from wild blueberries and lingonberries. *Plant Foods for Hum Nutr* 72: 360–364.
15. Ashour OM, Elberry AA, Alahdal AM, Mohamadi AMA, Nagy AA, Abdel-Naim AB, Abdel-Sattar EA, Mohamadin AM (2011). Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats. *Med Sci Monit* 17: 110-115.
16. Neto CC (2007). Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol Nutr Food Res* 51: 652-664.
17. Liu Y, Song X, Zhang D, Zhou F, Wang D, Wei Y, Ji B (2011). Blueberry anthocyanins: protection against ageing and light-induced damage in retinal pigment epithelial cells. *Br J Nutr* 108: 16-27.
18. Bertoglio JC, Folatre I, Bombardelli E, Riva A, Morazzoni P, Ronchi M, Petrangolini G (2012). Management of gastrointestinal mucositis due to cancer therapies in pediatric patients: results of a case series with SAMITAL®. *Future Oncol* 8: 1481–1486.
19. Liu CF, Liu C, Yao HHC (2012). Building pathways for ovary organogenesis in the mouse embryo. *Curr Top Dev Biol* 90: 263-290.
20. Familiari G, Makabe S, Motta PM (1991). Ultrastructure of the ovary. Kindle Edition, Pages: 1-17.
21. Hummitzsch K, Hatzirodos N, Macpherson AM, Schwartz J, Rodgers RJ, Rodgers HI (2019). Transcriptome analyses of ovarian stroma: tunica albuginea. *Reproduction* 157: 545-565.
22. Mcgee EA, Hsueh AJW (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21(2): 200–214.

23. Eroschenko VP (2007). DiFiore's atlas of histology with functional correlations. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 438-456.
24. Sadler TW (2014). Langman's medical embryology. Taylor C (Ed.), 12 th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer, 25-118.
25. Fujimoto T, Miyayama Y, Fuyuta M (1977). The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. Anat Rec 188: 315-330.
26. Wear HM, McPike MJ, Watanabe KH (2016). From primordial germ cells to primordial follicles: a review and visual, representation of early ovarian development in mice. J Ovarian Res 9: 1-11.
27. Yao HH (2005). The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. Mol Cell Endocrinol 230: 87–93.
28. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH (2014). Larsen's human embryology, Fifth edition. ISBN: 978-1-4557-0684-6, 978-1-4557-2791-9.
29. Scanlon VC, Senders T (2007). Essentials of anatomy and physiology. 5th ed. FA Davis Company, Philadelphia, 462-464.
30. Ross MH, Pawlina W (2014). Histology text and atlas. Histoloji konu anlatımı ve atlas, 6 th ed. Çeviren: Baykal B. Palme Yayıncılık, Ankara, 831-864.
31. Mescher AL (2016). Junqueira's basic histology text and atlas, Weitz M, Kearns B (Ed.), Mc Graw Hill Education. Pages: Sayfa: 461.
32. Krause WJ (2005). Krause's essential human histology for medical students. Third edition. Universal- Publishers, Columbia, Pages: 239-256.
33. Gartner LP, Hiatt JL, Strum JM (2010). Cell biology & histology, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 294-305.
34. Sarraj MA, Drummond AE (2012). Mammalian foetal ovarian development: consequences for health and disease. Reproduction 143(2): 151-163.
35. Karakoç L, Fındıklı N, Ünsal E, Enginsu E, Balaban B, Özkavukçu S, Ergin E (2019). Üremeye yardımcı tekniklerde laboratuvar teorik konular ve pratik uygulamaları, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara; Sayfa: 78-81.

36. Abir R, Orvieto R, Dicker D, Zukerman Z, Barnett M, Fisch B (2002). Preliminary studies on apoptosis in human fetal ovaries. *Fertil Steril* 78: 259–264.
37. Skinner MK (2005). Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 11: 461–471.
38. Oktay K, Karlikaya G, Akman O, Ojakian GK, Oktay M (2000). Interaction of extracellular matrix and activin-a in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. *Biol Reprod* 63: 457–461.
39. Wassarman PM (2008). Zona pellucida glycoproteins. *J Biol Chem* 283: 24285–24289.
40. Zhou J, Peng X, Mei S (2019). Autophagy in ovarian follicular development and atresia. *Int J Biol Sci* 15: 726–737.
41. Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB (2000). Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod* 63: 1245–1252.
42. Wang W, Liu H, Tian W, Zhang F, Gong Y, Chen J, Shi F (2010). Morphologic observation and classification criteria of atretic follicles in guinea pigs. *J Zhejiang Univ Sci B* 11: 307–314.
43. Yousaf M, Butt SA, Qamar K (2015). Count variation of ovarian follicles after immobilization. *Pak Armed Forces Med J* 65: 751–54.
44. Kitajima M, Khan KN, Harada A, Taniguchi K, Inoue T, Kaneuchi M, Miura K, Masuzaki H (2018). Association between ovarian endometrioma and ovarian reserve. *Front Biosci* 10: 92–102.
45. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. (2015). *Fertil Steril* 103(3): e9–e17. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.12.093.
46. Bedoschi G, Navarro PA, Oktay K (2016). Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact. *Future Oncol* 12: 2333–2344.
47. Findlay JK, Hutt KJ, Hickey M & Anderson RA (2015). How is the number of primordial follicles in the ovarian reserve established? *Biol Reprod* 93: 111.
48. Tal R, Seifer DB (2017). Ovarian reserve testing: a user's guide. *Am J Obstet Gynecol* 217(2): 129–140.

49. Ge W, Li L, Dyce PW, De Felici M, Shen W (2019). Establishment and depletion of the ovarian reserve: physiology and impact of environmental chemicals. *Cell Mol Life Sci* 76: 1729-1746.
50. Ede AE, Laan RFJM, Blom HJ, Abreu RAD, Putte LBA (1998). Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum* 27: 277-292.
51. Ma L, Wang C, He Z, Cheng B, Zheng L, Huang K (2017). Peptide-drug conjugate: a novel drug design approach. *Curr Med Chem* 24: 3373-3396.
52. Mashhadi M, Mohammadi M, Bakhshipour A, Keikhaei M, Sandoughi M, Heidari Z, Sanadgol H, Mashhadi A (2011). High dose methotrexat liver toxicity. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 5: 16-19.
53. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Serio B, Straub RH (2001). Anti-inflammatory mechanisms of Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 60: 729–735.
54. Yamauchi PS, Rizk D, Kormeili T, Patnaik R, Lowe NJ (2003). Current systemic therapies for psoriasis: where are we now? *J Am Acad Dermatol* 49: 66–77.
55. Czarnecka-Operacz M, Sadowska-Przytocka A (2014). The possibilities and principles of Methotrexate treatment of psoriasis – the updated knowledge. *Postepy Dermatol Alergol* 31(6): 392–400.
56. Bath RK, Brar NK, Forouhar FA, Wu GY (2014). A review of Methotrexate-associated hepatotoxicity. *J Dig Dis* 15: 517–524.
57. Baggott JE, Vaughn HN, Hudson BB (1986). Inhibition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase, adenosine deaminase and 5'-adenylate deaminase by polyglutamates of Methotrexate and oxidized folates and by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and ribotide. *Biochem J* 236: 193–200.
58. Kazancı E, Gülen H, Erbay A, Vergin C (2011). Treatment of intrathecal Methotrexate overdose with folinic acid rescue and lumbar cerebrospinal fluid exchange: A report of two cases. *Turk J Hematol* 28(1): 63-67.

59. Burmester GR, Kaeley GS, Kavanaugh AF, Gabay C, MacCarter DK, Nash P, Takeuchi T, Goss SL, Rodila R, Chen K, Kupper H, Kalabic J (2017). Treatment efficacy and Methotrexate-related toxicity in patients with rheumatoid arthritis receiving Methotrexate in combination with adalimumab. *RMD Open* 3: e000465.
60. Kyaw MT, Sakthiswary R, Ani Amelia Z, Rahana AR, Munirah MM (2020). Effects of Methotrexate therapy on the levels of gonadotropic hormones in rheumatoid arthritis patients of reproductive age. *Cureus* 12(4): e7632. doi:10.7759/cureus.7632.
61. Sen CK (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc* 33: 368-70.
62. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266: 37-56.
63. Kehrer JP, Klotz LO (2015). Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. *Crit Rev Toxicol* 45(9): 765-798.
64. Genestra M (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal* 19: 1807-1819.
65. Shinde A, Ganu J, Naik P (2012). Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review. *J Dent Allied Sci* 1: 63-66.
66. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 4: 89-96.
67. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 1-13.
68. Devine PJ, Perreault SD, Luderer U (2012). Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biol Reprod* 86: 27.
69. Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: current status and future prospect. *Int J Pharmaceutical Sci Rev Res* 3: 91-100.
70. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal* 5: 9-19.

71. Catalá A (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1482-1495.
72. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK, Pakuwal U (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 4405-4409.
73. Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol* 300: 156-166.
74. Bartosz G (2010). Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radic Res* 44: 711-720.
75. Erel O (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 37: 277-285.
76. Erel O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38: 1103-1111.
77. Krishnamurthy P, Wadhwani A (2012). Antioxidant enzymes and human health. Antioxidant enzyme. InTech Janeza Trdine, Rijeka, Pages: 3-18.
78. Anantachoke N, Lomarat P, Praserttirachai W, Khammanit R, Mangmool S (2016). Thai fruits exhibit antioxidant activity and induction of antioxidant enzymes in HEK-293 cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016: 1–14.
79. Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem* 49: 5315–5321.
80. Turkben C, Barut E, İncedayı B (2008). Investigations on population of blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Uludag (MOUNT OLYMPUS) in Bursa, Turkey. *Mediterr Agric Sci* 21: 41–44.
81. Kandziora-Ciupa M, Nadgórska-Socha A, Barczyk G, Ciepał R (2017). Bioaccumulation of heavy metals and ecophysiological responses to heavy metal stress in selected populations of *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium vitis-idaea* L. *Ecotoxicology* 26: 966–980.
82. Uruk T, Kahraman S (2017). Yaban Mersini (*Vaccinium myrtillus*) Şarabının antioksidan aktivitesinin araştırılması. *Iğdır University Journal of the Institute of Science and Technology* 7(4): 77-83.

83. Navikaite V, Simanaviciute D, Klimaviciute R, Jakstas V, Ivanauskas L (2016). Interaction between κ - and ι -carrageenan and anthocyanins from *Vaccinium myrtillus*. Carbohydr Polym 148: 36-44.
84. Koca G, Karadeniz B, Tural S (2006). Antosiyaninlerin antioksidan aktivitesi. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, 24-26 Mayıs 2006, 133-136.
85. Estupinan DC, Schwartz SJ, Garzon GA (2011). Antioxidant activity, total phenolics content, anthocyanin, and color stability of isotonic model beverages colored with Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) anthocyanin powder. J Food Sci 76: 26-34.
86. Hidalgo GI, Almajano M (2017). Red Fruits: Extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: a review. Antioxidants 6(1): 7.
87. Ma L, Sun Z, Zeng Y, Luo M, Yang J (2018). Molecular mechanism and health role of functional ingredients in blueberry for chronic disease in human beings. Int J Mol Sci 19: 2785.
88. Chu WK, Cheung SCM, Lau RAW, Benzie IFF (2011). Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S (Eds). Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd ed. Taylor & Francis Group, Boca Raton (FL): 55-72.
89. Sun J, Sugiyama A, Inoue S, Takeuchi T, Furukawa S (2014). Effect of Methotrexate on neuroepithelium in the rat fetal brain. J Vet Med Sci 76: 347-354.
90. Pandir D, Kara O (2014). Chemopreventive effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against Cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage as shown by the comet assay in peripheral blood of rats. Biologia, 69(6): 811-816.
91. Demir S, Turan I, Demir F, Ayazoglu Demir E, Aliyazicioglu Y (2017). Cytotoxic effect of *Laurocerasus officinalis* extract on human cancer cell lines. Marmara Pharmaceutical Journal 21: 121-126.
92. Turan I, Demir S, Kilinc K, Arslan Burnaz N, Ozer Yaman S, Akbulut K, Mentese A, Aliyazicioglu Y, Deger O (2017). Antiproliferative and apoptotic effect of *Morus nigra* extract on human prostate cancer cells. Saudi Pharm J 25: 241-24.
93. Slinkard K, Singleton VL (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am J Enol Vitic 28: 49-55.

94. Misir S, Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, Ozer Yaman S, Deger O (2018). Antioxidant properties and protective effect of Turkish propolis on t-BHP-induced oxidative stress in foreskin fibroblast cells. *IJPER* 52: 94-100.
95. Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
96. Demir S, Turan I, Aliyazicioglu Y (2019). Antioxidant properties of *Primula vulgaris* flower extract and its cytotoxic effect on human cancer cell lines. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi* 22: 78-84.
97. Oyaizu M (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese J Nutr* 44: 307-315.
98. Turan I, Demir S, Aliyazıcıoğlu R, Aliyazıcıoğlu Y (2017). Evaluation of antioxidant and cytotoxic properties of *Primula vulgaris* leaf extract. *Kahramanmaraş Sutcu Imam University Journal of Natural Sciences* 20: 361-367.
99. Uluğ 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. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 181: 205-209.
100. Tusat M, Mentese A, Demir S, Alver A, Imamoglu M (2017). Medical ozone therapy reduces oxidative stress and testicular damage in an experimental model of testicular torsion in rats. *Int Braz J Urol* 43: 1160-1166.
101. Blumenfeld Z (2012). Chemotherapy and fertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 26: 379–390.
102. Meistrich ML (2013). Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril* 100: 1180-6.
103. Fleischer RT, Vollenhoven BJ, Weston GC (2011). The effects of chemotherapy and radiotherapy on fertility in premenopausal women. *Obstet Gynecol Surv* 66: 248–254.
104. Rodriguez Wallberg KA, Oktay K (2012). Options on fertility preservation in female cancer patients. *Cancer Treat Rev* 38(5): 354–361.

105. Yulug E, Turedi S, Alver A, Turedi S, Kahraman C (2015). Effects of resveratrol on Methotrexate-induced intestinal injury. *Bratisl Lek Listy* 116: 676–680.
106. Savran M, Cicek E, Doguc D, Asci H, Yesilot S, Candan I, Ozer M (2017). Vitamin C attenuates Methotrexate-induced oxidative stress in kidney and liver of rats. *Physiol Int* 104: 139–149.
107. Turkler C, Onat T, Yildirim E, Kaplan S, Yazici GN, Mammadov R, Sunar M (2020). An experimental study on the use of lycopene to prevent infertility due to acute oxidative ovarian damage caused by a single high dose of Methotrexate. *Adv Clin Exp Med* 29: 5-11.
108. Erdogan E, Ilgaz Y, Gurgor PN, Oztas Y, Topal T, Oztas E (2015). Rutin ameliorates Methotrexate induced hepatic injury in rats. *Acta Cir Bras* 30: 778–784.
109. Babiak RMV, Campello AP, Carnieri EGS, Oliveira MBM (1998). Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct* 16: 283–293.
110. Güney C (2019). Erişkin sıçan ovaryumunda Metotreksat hasarına karşı karayemişin etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
111. Pandir D, Kara Ö (2013). Cisplatin-induced kidney damage and the protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.): an experimental study. *Turk J Med Sci* 43: 951–956.
112. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett* 387: 95-105.
113. Samdanci ET, Huz M, Ozhan O, Tanbek K, Pamukcu E, Akatli AN, Parlakpınar H (2018). Cytoprotective effects of molsidomine against Methotrexate-induced hepatotoxicity: an experimental rat study. *Drug Des Devel Ther* 13: 13-21.
114. 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. *J Food Drug Anal* 25: 890–897.
115. Abdel Raheem IT, Khedr NF (2013). Renoprotective effects of montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor antagonist, against Methotrexate-induced kidney damage in rats. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 387(4): 341–353.
116. Abraham P, Kolli VK, Rabi S (2010). Melatonin attenuates Methotrexate-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Cell Biochem Funct* 28: 426–433.

117. Ahmed W, Zaki A, Nabil T (2015). Prevention of Methotrexate-induced nephrotoxicity by concomitant administration of garlic aqueous extract in rat. *Turk J Med Sci* 45: 507-16.
118. Hortu I, Ozceltik G, Ergenoglu AM, Yigitturk G, Atasoy O, Erbas O (2020). Protective effect of oxytocin on a Methotrexate-induced ovarian toxicity model. *Arch Gynecol Obstet* 301: 1317-1324.
119. Yapca OE, Börekci B, Turan IM, Gulapoglu M, Salman S (2014). The effect of mirtazapine on Methotrexate-induced oxidative damage and infertility in rats. *Science Asia*, 40: 152-156.
120. Pandir D, Kara O, Kara M (2014). Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) on cisplatin induced ovarian damage in rat. *Cytotechnology* 66: 677–685.
121. Arslan A, Ozcicek F, Keskin Cimen F, Altuner D, Yarali O, Kurt N, Tumkaya L, Ozturk C, Suleyman H (2015). Protective effect of resveratrol against Methotrexate-induced oxidative stress in the small intestinal tissues of rats. *Int J Clin Exp Med* 8: 10491-500.
122. Kannan K, Jain SK (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophys* 7(3): 153-163.
123. D'Arcy MS (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* 43: 582-592.
124. Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495–516.
125. Ekinci Akdemir RFN, Yildirim S, Kandemir RFM, Gülçin İ, Küçükler S, Sağlam YS, Yakan S (2018). The effects of casticin and myricetin on liver damage induced by Methotrexate in rats. *Iran J Basic Med Sci* 21: 1281-1288.
126. Owumi S, Ajijola I, Agbeti O (2019). Hepatorenal protective effects of protocatechuic acid in rats administered with anticancer drug Methotrexate. *Hum Exp Toxicol* 38: 1254-1265.
127. Sakalli Çetin E, Tetiker H, İlhan Çelik Ö, Yılmaz N, Ciğerci İH (2017). Methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: Protective effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extract. *Complement Med Res* 24: 364–370.
128. Daggulli M, Dede O, Utangac MM, Bodakci MN, Hatipoglu NK, Penbegul N, Sancaktutar AA, Bozkurt Y, Türkçü G, Yüksel H (2014). Protective effects of carvacrol against Methotrexate-induced testicular toxicity in rats. *Int J Clin Exp Med* 7: 5511-6.

129. Güven E, Erişgin Z ve Tekelioğlu Y (2017). Sıçanlarda Metotreksat kaynaklı testis hasarı üzerine Shilajitin'in histopatolojik etkisi. Kocatepe Tıp Dergisi 18: 1-6.
130. Tag HM (2015). Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against Methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. BMC Complement Altern Med 15:252.
131. Mohamed DI, Khairy E, Tawfek SS, Habib EK, Fetouh MA (2019). Coenzyme Q10 attenuates lung and liver fibrosis via modulation of autophagy in Methotrexate treated rat. Biomed Pharmacother 109:892-901.
132. Taskin MI, Yay A, Adali E, Balcioglu E, Inceboz U (2015). Protective effects of sildenafil citrate administration on Cisplatin-induced ovarian damage in rats. Gynecol Endocrinol 31: 272–277.
133. Gol M, Saygili U, Koyuncuoglu M, Uslu T (2009). Influence of high-dose Methotrexate therapy on the primordial follicles of the mouse ovary. J Obstet Gynaecol Res 35: 429-433.
134. Karri S, G V (2010). Effect of Methotrexate and leucovorin on female reproductive tract of albino rats. Cell Biochem Funct 29(1): 1-21.



EKLER

Ek 1. Etik Kurulu Onayı



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

Sayı : 53488718 - 493
Konu: Onay Belgesi

05/07/2018

Sayın, Dr. Öğr. Üyesi Gökçen KERİMOĞLU
Histoloji ve Embriyoloji ABD. Öğretim Üyesi

"Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Ovaryum Hasarına Karşı Yaban Mersini'nin (*Vaccinium myrtillus*) Etkilerinin İncelenmesi" başlık ve 2018/23 protokol numaralı çalışma önerisi Kurulumuzca incelenmiş olup; yürürlükteki etik ilke ve kurallara uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Ahmet AYAR
Hayvan Dencyleri Etik Kurul Başkanı

Ek: 1 adet onay belgesi

61080 - Trabzon / TÜRKİYE

Tel: +90 (462) 377 5403

Faks: +90(462)325 2270

Elektronik Ağ: www.ktu.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin İrtibat
Şerafettin YILMAZ
e posta:
serafettinyilmaz@ktu.edu.tr

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 61080 /Trabzon
	TELEFON	0462- 3775853—0462-3775403
	FAKS, E- posta	0462- 3252270 – etikhd@ktu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ETİK KURUL DOSYA NO:		2018 / 23	
	ÇALIŞMANIN ADI		"Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Ovaryum Hasarına Karşı Yaban Mersini"nin (Vaccinium myrtillus) Etkilerinin İncelenmesi"	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI		ÖNVANI/ADI/SOYADI Dr.Öğr.Üyesi Gökçen KERİMOĞLU	
			UZMANLIK ALANI Histoloji ve Embriyoloji	
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR, ÖNVANI/ADI/SOYADI		Yük.Lis.Öğr.Gamze BİLGİN, Prof.Dr.Servet KERİMOĞLU, Prof.Dr.Yüksel ALIYAZICIOĞLU, Doç.Dr.Selim DEMİR,	
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ		TEZ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2	Tarih: 03/07/2018
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak KTÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'na incelenmiş; yapılan inceleme sonucunda araştırmanın KTÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Yönergesi'ne uygun bulunarak onaylanmasına ve araştırmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.	
	ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYILARI	21 Adet Sıçan
	BAŞLANGIÇ Tarihi ve ETİK KURUL İZİN SÜRESİ:	

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı Etik Kurul Üyeligi	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma ile İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ahmet AYAR Başkan	Fizyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.Serdar TÜRKİYİLMAZ Başkan V.	Genel Cerrahi	KTÜ Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ABD,	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.Ali CANSU Üye	Pediyatri	KTÜ Tıp Fakültesi Pediyatri ABD,	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	KATILMADI
Prof. Dr. Engin YENİLMEZ Üye	Histoloji ve Embriyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç.Dr.Zerrin PULATHAN Üye	Kalp ve Damar Cerrahisi	KTÜ Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi ABD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç. Dr. Celal ÇANDIRLI Üye	Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi	KTÜ Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ABD,	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	KATILMADI
Prof.Dr.Rezzan ALİYAZICIOĞLU Üye	Temel Eczacılık Bilimleri Biyokimya	KTÜ Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri ABD,	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.Nadir BAŞÇINAR Üye	Balıkçılık Teknolojisi	KTÜ Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç.Dr.İsmail ABİDİN Üye	Biyofizik	KTÜ Tıp Fakültesi Biyofizik ABD,	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	KATILMADI
Dr.Öğr.Üyesi Emel ÇAKIR Üye	Tıbbi Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji ABD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Sait AL Üye	Veteriner Hekim	KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Uzm.Dr.Nuran AYDIN Üye	Nöroloji	Kanuni Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Bölümü	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	KATILMADI
Eczacı Nazım ÖZTUNA (Üye)	Eczacı		E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	

CamScanner ile tarandı

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : Bilgin, Gamze
Uyruğu : T.C
Doğum Tarihi ve Yeri : Aralık 1992, FATİH
Telefon (İş) : 5318708110
E-Posta : gamzebilgiin@hotmail.com
Yazışma Adresi (İş) : Karadeniz Teknik Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı C blok Trabzon

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi-Biyoloji Bölümü	2016
Lise	Bağcılar Anadolu Lisesi	2010

YABANCI DİL

İngilizce