



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA GENTAMİSİN KAYNAKLI
OVARYUM HASARINA KARŞI KUERSETİNİN
ETKİLERİ**

Ayşen Cemre AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Esin YULUĞ

TRABZON-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve 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 aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih
Ayşen Cemre AYDIN

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

xv

ABSTRACT

xvi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Ovaryum Embriyolojisi

3

2.2. Ovaryum Anatomisi

8

2.3. Ovaryum Histolojisi

11

2.3.1. Ovaryum Folikül Gelişimi

12

2.3.2. Primordiyal Folikül

15

2.3.3. Primer Folikül

16

2.3.4. Sekonder Folikül

18

2.3.5. Graaf Folikül

19

2.3.6. Atretik Folikül

20

2.4. Gentamisin

20

2.4.1. Gentamisin Etki Mekanizması

21

2.4.2. Gentamisin Toksisitesi

21

2.5. Oksidatif Stres

22

2.6. Kuersetin

22

2.6.1. Kuersetinin Vücutta Emilimi

23

2.6.2. Kuersetinin Biyolojik Etkileri

24

3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Deney Hayvanlarının Temini, Etik Onay ve Barınma Koşulları	27
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Uygulanan İşlemler	28
3.3. Doku Numunelerinin Elde Edilmesi	29
3.4. Histolojik İşlemler	30
3.4.1. Histolojik Analizler İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması	30
3.4.2. Dokuların Fikse Edilmesi	30
3.4.3. Dokuların Takibi	31
3.4.4. Hematoksilen & Eozin Boyama Yöntemi	32
3.4.5. Histolojik Ölçümler	33
3.4.6. Masson Trikrom Boyama Yöntemi	35
3.4.7. Periodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi	35
3.5. Biyokimyasal İncelemeler	36
3.5.1. Plazma MDA Ölçümü	37
3.5.2. Doku MDA Ölçümü	38
3.5.3. CAT Enzim Aktivitesinin Ölçümü	40
3.5.4. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü	41
3.5.5. GPx Aktivite Ölçümü	43
3.5.6. Protein Tayini	43
3.6. İstatistiksel Analiz	43
4. BULGULAR	44
4.1. Vücut Ağırlıkları ve Ovaryum Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	44
4.2. Ovaryum Folikül Sayılarının Değerlendirilmesi	45
4.3. Morfolojik Bulgular	47
4.3.1. Histopatolojik Değerlendirme	47
4.3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama ile Histopatolojik Değerlendirme	50
4.3.3. Masson Trikrom Boyama ile Histopatolojik Değerlendirme	61
4.3.4. PAS Boyama ile Histopatolojik Değerlendirme	65
4.4. Biyokimyasal Bulgular	68
4.4.1. Plazma Biyokimyası	68
4.4.2. Doku Biyokimyası	69
5. TARTIŞMA	74

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	82
7. KAYNAKLAR	84
EKLER	105
EK 1.Etik Kurul Onayı	106
ÖZGEÇMİŞ	108



TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Deney grupları ve uygulanan işlemler	28
Tablo 2. Doku takip aşamaları	31
Tablo 3. Hematoksilen eozin boyama aşamaları	33
Tablo 4. Foliküllerin sınıfları ve morfolojik özellikleri	34
Tablo 5. Masson trikrom boyama yöntemi	35
Tablo 6. Periodik Asit Schiff boyama aşamaları	36
Tablo 7. Doku MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı	39
Tablo 8. Katalaz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı	40
Tablo 9. SOD aktivitesi ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları	42
Tablo 10. Hayvan ağırlıkları ve over ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırılması	44
Tablo 11. Ovaryum folikül sayılarının istatistik verileri	46
Tablo 12. Ovaryum doku skorlamasının istatistik verileri	47
Tablo 13. Plazma MDA istatistiksel verilerinin gruplar arasında karşılaştırılması	69
Tablo 14. Doku MDA istatistiksel verilerinin gruplar arasında karşılaştırılması	70
Tablo 15. Doku SOD istatistiksel verilerinin gruplar arasında karşılaştırılması	71
Tablo 16. Doku CAT istatistiksel verilerinin gruplar arasında karşılaştırılması	72
Tablo 17. Doku GPx istatistiksel verilerinin gruplar arasında karşılaştırılması	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Folikülogenez şematik çizimi	13
Şekil 2. Primordiyal folikülün şematik çizimi	15
Şekil 3. Unilaminar primer folikül şematik çizimi	16
Şekil 4. Multilaminar primer folikül şematik çizimi	17
Şekil 5. Sekonder folikül şematik çizimi	18
Şekil 6. Graaf folikül şematik çizimi	19
Şekil 7. Serum örneklerinde MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği	39
Şekil 8. Over dokularında MDA aktivitesini hesaplamak için kullanılan standart grafiği	40
Şekil 9. Over dokularında SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan standart grafiği	42
Şekil 10. Over dokularında protein seviyelerini hesaplamak için kullanılan standart grafiği	43
Şekil 11. Hayvan ağırlıkları ve over ağırlıklarının istatistik grafiği	44
Şekil 12. Gruplara ait ovaryum folikül sayılarının istatistik grafiği	46
Şekil 13. Gruplara ait ovaryum foliküller hücre dejenerasyonu istatistik grafiği	48
Şekil 14. Gruplara ait vasküler konjesyon istatistik grafiği	48
Şekil 15. Gruplara ait germinal epitel dejenerasyonu istatistik grafiği	49
Şekil 16. Gruplara ait inflamatuvar hücre istatistik grafiği	49
Şekil 17. Gruplara ait fibrozis istatistik grafiği	50
Şekil 18. Gruplara ait plazma MDA istatistik grafiği	69
Şekil 19. Gruplara ait doku MDA istatistik grafiği	70
Şekil 20. Gruplara ait doku SOD istatistik grafiği	71
Şekil 21. Gruplara ait doku CAT istatistik grafiği	72
Şekil 22. Gruplara ait doku GPx istatistik grafiği	73

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. Germinal epitel ovaryum IM görüntüsü (H&E 400X)	11
Resim 2. Graaf folikül ovaryum IM görüntüsü (H&E 400X)	19
Resim 3. Atretik folikül ovaryum IM görüntüsü (H&E 200X)	20
Resim 4. Kuersetin kimyasal yapısı	23
Resim 5. Sıçanların barındırıldığı Tip III kafesler	27
Resim 6. Sıçanlara gentamisin i.p. yoluyla verilmesi	29
Resim 7. Sıçanlara kuersetinin oral gavaj yoluyla verilmesi	29
Resim 8. Ovaryum dokularının çıkarılması	30
Resim 9. K grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 100X)	51
Resim 10. K grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 400X)	52
Resim 11. K grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 400X) 2	52
Resim 12. GEN grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 100X)	53
Resim 13. GEN grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 200X)	54
Resim 14. GEN grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 400X)	54
Resim 15. GEN+QCT1 grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 400X)	55
Resim 16. GEN+QCT1 grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 400X) 2	56
Resim 17. GEN+QCT1 grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 400X) 3	56
Resim 18. GEN+QCT2 grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 100X)	57
Resim 19. GEN+QCT2 grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 200X)	58
Resim 20. QCT1 grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 200X)	59
Resim 21. QCT1 grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 400X)	59
Resim 22. QCT2 grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 100X)	60
Resim 23. QCT2 grubu ovaryum IM görüntüsü (H&E 200X)	61
Resim 24. K grubu ovaryum IM görüntüsü (Masson Trikrom 200X)	62
Resim 25. GEN grubu ovaryum IM görüntüsü (Masson Trikrom 200X)	62
Resim 26. GEN+QCT1 grubu ovaryum IM görüntüsü (Masson Trikrom 200X)	63
Resim 27. GEN+QCT2 grubu ovaryum IM görüntüsü (Masson Trikrom 200X)	63
Resim 28. QCT1 grubu ovaryum IM görüntüsü (Masson Trikrom 200X)	64
Resim 29. QCT2 grubu ovaryum IM görüntüsü (Masson Trikrom 200X)	64
Resim 30. K grubu ovaryum IM görüntüsü (PAS 400X)	65

Resim 31.	GEN grubu ovaryum IM görüntüsü (PAS 400X)	66
Resim 32.	GEN+QCT1 grubu ovaryum IM görüntüsü (PAS 400X)	66
Resim 33.	GEN+QCT2 grubu ovaryum IM görüntüsü (PAS 400X)	67
Resim 34.	QCT1 grubu ovaryum IM görüntüsü (PAS 400X)	67
Resim 35.	QCT2 grubu ovaryum IM görüntüsü (PAS 400X)	68



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AF	Atretik folikül
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
CAT	Katalaz
COX	Siklooksijenaz
CuZn-SOD	Bakır/çinko süperoksit dismutaz
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
Emx2	Empty spiracles homeobox
FSH	Follicle-stimulating hormone
GEN	Gentamisin
GEN+QCT 1	Gentamisin+kuersetin 1
GEN+QCT 2	Gentamisin+kuersetin 2
GF	Graaf folikül
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
H&E	Hematoksilen & eozin
hCG	Human koriyonik gonodotropin
IM	Işık mikroskop
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
KTÜCAM	KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi
LH	Luteinizan hormon
Lhx9	Lim homeobox9
MDA	Malondialdehit
MGH	Mural granüloza hücreleri
MIS	Müllerian inhibe edici hormon
MPF	Multilaminar primer folikül
OMİ	Oosit matürasyon inhibitörü
OS	Oksidatif stres
PAS	Periyodik asit-Schiff
PF	Primordiyal folikül

PGH	Primordiyal germ hücreleri
POF	Erken ovaryan yetmezlik
QCT1	Kuersetin 1
QCT2	Kuersetin 2
ROS	Reaktif oksijen türleri
Rspo1	R-spondin 1 geni
sf1	Steroidogenik faktör1
SOD	Süperoksit dismutaz
SRX	Sex determining region on Y
TDF	Testis belirleyici faktör
TGF-β	Transforme büyüme faktörü-β
TNF-α	Tümör nekroz faktör-α
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu
UPF	Unilaminar primer folikül
UV	Ultraviyole
Wnt	Wingless-related integration site
Wt1	Wilms tümör geni 1
ZP	Zona pellusida
Simgeler	
°C	Santigrad derece
cm	Santimetre
dk	Dakika
gr	Gram
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
Formüller	
6-OHDA	6-hidroksidopamin
H₂O₂	Hidrojen peroksit
OH	Hidroksil
(NH₄)₂SO₄	Amonyum sülfat

ÖZET

Sıçanlarda Gentamisin Kaynaklı Ovaryum Hasarına Karşı Kuersetinin Etkileri

Bu çalışma, oksidatif stresi arttırıcı etkilere sahip bir ajan olan gentamisinin (GEN) ve güçlü antioksidan özelliğe sahip olan kuersetinin (QCT), ovaryum üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve GEN in ovaryum üzerinde bir hasar oluşturmaması durumunda QCT nin bu hasarı önleme ya da tedavi etme kapasitesinin araştırılması amacıyla tasarlanmıştır. Çalışmada 36 adet Sprague Dawley ırkı sıçan kullanılarak, 6 grup oluşturulmuştur. Deney süresi 7 gün olarak planlanmıştır. Birinci grup kontrol grubu (K) olarak belirlenmiştir. GEN, GEN+QCT1, GEN+QCT2 gruplarına 7 gün boyunca 100 mg/kg GEN intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmıştır. GEN+QCT1 grubuna 20 mg/kg QCT, GEN+QCT2 grubuna 50mg/kg QCT gavaj yoluyla uygulanmıştır. QCT1 grubuna, 20mg/kg QCT ve QCT2 grubuna 50mg/kg QCT gavaj yoluyla uygulanmıştır. Ovaryumun histopatolojik değerlendirmesinde, foliküler hücre dejenerasyonu (FHD), vasküler konjesyon (VK), germinal epitel dejenerasyonu (GED), inflamatuvar hücre (İH) ve fibrozis (F) GEN grubunda anlamlı derecede artmış olduğu görülmüştür. GEN+QCT tedavi gruplarında bu hasarın azaldığı tespit edilmiştir. QCT2 grubunda VK, GED, İH histopatolojileri kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir. Biyokimyasal analizler sonucu GEN grubunda plazma MDA ve doku MDA da anlamlı artış, SOD, CAT, GPx değerlerinde anlamlı azalış tespit edilmiştir. GEN+QCT tedavi grupları doku MDA'yı kısmen düşürse de istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş sağlayamamıştır. SOD ve GPx değerlerinde GEN+QCT gruplarında GEN grubuna göre artış olsa da anlamlı değildir. CAT, GEN+QCT gruplarında GEN grubuna göre anlamlı artış göstermiştir. Biyokimyasal analiz sonuçlarına bakıldığında GEN'in ovaryum dokusunda oksidatif stresi arttırdığı ve QCT'nin doza bağlı şekilde bu hasarı hafifletebileceği görülmüştür. Histopatolojik değerlendirme sonuçları bize GEN'in ovaryum doku morfolojisine hasar verdiğini göstermiştir. QCT'nin bazı parametrelerde GEN'e karşı koruyuculuk sağladığı görülse de tek başına uygulandığında, özellikle yüksek dozlarda prooksidan etki gösterebileceği görülmüştür. Çalışmamızın, GEN'in ovaryum dokusuna verdiği hasarı ve QCT'nin bu hasarı azaltıcı etkisini, histopatolojik bulgular ve biyokimyasal analizlerle belgeleyerek literatüre katkı sağladığını düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Biyokimya, Gentamisin, Histopatoloji, Kuersetin, Ovaryum

ABSTRACT

Effects of Quercetin Against Gentamicin-Induced Ovarian Injury in Rats

This study aimed to determine the effects of gentamicin (GEN), an agent with oxidative stress-increasing effects, and quercetin (QCT), which has strong antioxidant properties, on the ovary and to investigate the capacity of QCT to prevent or treat this damage in case the GEN causes damage to the ovary. In the study, 6 groups were formed by using 36 Sprague Dawley rats. The duration of the experiment was planned as 7 days. The first group was determined as the control group (K). GEN, GEN+QCT1, GEN+QCT2 groups were administered 100 mg/kg GEN intraperitoneally (i.p.) for 7 days. 20 mg/kg of QCT was administered to the GEN+QCT1 group, and 50mg/kg of QCT was administered to the GEN+QCT2 group by gavage. QCT1 group was administered 20mg/kg QCT and QCT2 group 50mg/kg QCT was administered by gavage. In the histopathological evaluation of the ovary, follicular cell degeneration (FHD), vascular congestion (VC), germinal epithelial degeneration (GED), inflammatory cell (IH) and fibrosis (F) were found to be significantly increased in the GEN group. This damage was found to be reduced in the GEN+QCT treatment groups. The histopathologies of VK, GED and IH in the QCT2 group showed a significant increase compared to the control group. As a result of biochemical analyzes, a significant increase in plasma MDA and tissue MDA, and a significant decrease in SOD, CAT, GPx values were detected in the GEN group. Although the GEN+QCT treatment groups partially reduced tissue MDA, it did not achieve a statistically significant decrease. Although there was an increase in SOD and GPx values in the GEN+QCT groups compared to the GEN group, it was not significant. CAT showed a significant increase in the GEN+QCT groups compared to the GEN group. Looking at the results of the biochemical analysis, it was seen that GEN increased the oxidative stress in the ovarian tissue and QCT could alleviate this damage in a dose-dependent manner. Histopathological evaluation results showed us that the GEN damaged the ovarian tissue morphology. Although QCT seems to provide protection against GEN in some parameters, it has been observed that it can have a prooxidant effect when administered alone, especially at high doses. We think that our study contributes to the literature by documenting the damage of GEN to the ovarian tissue and the reducing effect of QCT with histopathological findings and biochemical analyzes.

Keywords: Biochemistry, Gentamicin, Histopathology, Quercetin, Ovary

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite, 12 ay veya daha fazla ardışık korunmasız cinsel ilişkiden sonra gebelik elde edilememesi olarak tanımlanan önemli bir tıbbi sorundur. İnfertilitenin dünya çapında çiftlerin %8 ila %12 sini etkilediği tahmin edilmektedir (1). Dünya genelinde yaklaşık 186 milyon insan infertiliteden muzdarip olup, bunların büyük çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde ikamet etmektedir (2). İnfertilite kadın ve erkeğin fizyolojik yeterliliğine bağlı olduğu gibi çoğu zaman üreme yolu enfeksiyonlarına bağlı olarak da ortaya çıkabilir (3). Kadın infertilitesinin dünya genelinde en yaygın şekli üreme yolu enfeksiyonlarına bağlı olarak gözlenmektedir (4). Yine bu enfeksiyonlarda kullanılan kimyasal ajanların bir yandan tedavi ederken diğer yandan üreme sağlığını olumsuz yönde etkileyebilecek hasarlara sebep olabilecekleri bilinen bir gerçektir (5).

Gentamisin aminoglikozid türevi bir antibiyotiktir ve özellikle gram negatif organizmaların neden olduğu birçok bakteriyel enfeksiyon tedavisinde kullanılır (6). Gentamisin, oksijene bağımlı olarak aktif taşıma yoluyla gram negatif bakteri zarından geçerek, bakterinin 30S ribozomal alt birimine bağlanır. Bu bağlanma ile bakterinin mRNA translasyonu bozularak işlevsiz protein sentezine ve sonuç olarak bakterinin ölümüne yol açar (7). Tüm aminoglikozidlerde olduğu gibi gentamisin ağızdan verildiğinde sistemik olarak aktif değildir. Bunun nedeni ise ince bağırsaktan kayda değer ölçüde emilememesidir. Bu sebepten dolayı gentamisin enfeksiyon tedavisinde intravenöz, intramüsküler veya topikal olarak uygulanır (8).

Gentamisin birçok enfeksiyon türünde kullanıldığı gibi kadın genital enfeksiyonları ve doğum sonrası enfeksiyonlarında da sıkça kullanılan bir antibiyotiktir (9). Ancak klinik kullanımında ototoksisite, nefrotoksisite ve benzeri sınırlayıcı ciddi yan etkileri mevcuttur (10, 11). Son yıllarda yapılan çalışmalarda gentamisinin üreme organlarında da hasar oluşturabileceği görülmüştür (12). Gentamisin tedavisi sonrası testis dokusunda atrofi, dejenerasyon ve spermatogenez kaybı geliştiği bildirilmektedir (13, 14).

Gentamisinin bu yan etkilerinin ortaya çıkışındaki önemli mekanizmalardan biri reaktif oksijen türlerinin üretimini ve dolayısıyla oksidatif stresi arttırmasıdır (15). Oksidatif stres (OS), reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve nötralizasyonu arasındaki dengesizlik nedeniyle ortaya çıkar. Oksidatif stres; granüloza hücrelerinin apoptozunda artış, kromozomal ayrılmama durumları, dölleme başarısızlığı ve embriyo yeterliliğinin azalması gibi istenmeyen durumlarda rol alan etmenlerden birisidir (16).

Oksidatif stres, oositin gelişimsel yeterliliğini bozmakla beraber erken yumurtalık yetmezliği (POF) dâhil olmak üzere yumurtalık disfonksiyonunun ana kaynaklarından birisidir (17). Bu nedenlerden dolayı yüksek seviyelerde reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ve oksidatif stres artışına sebep olan gentamisin gibi oksidatif stresi arttıran ajanların kullanımının, bir yandan infertiliteye sebep olan genital enfeksiyonları tedavi ederken diğer yandan kendisinin de infertiliteye ön ayak olup olmadığı sorusu ortaya çıkmaktadır.

Üreme sağlığı açısından gentamisin gibi kimyasal ajanlar sebebiyle azalmış antioksidan savunmasını güçlendirmeye yönelik çalışmalar umut verici sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir (18, 19). Günümüzde infertilite tedavilerinin genişletilmesi hususunda artan ilgi doğal antioksidanların potansiyel faydasına odaklanmaktadır (20).

Kuersetin elma, çilek, kiraz, vişne, yaban mersini gibi birçok meyvede; kırmızı soğan, biber, yeşil ve siyah çay, kuşkonmaz gibi bitkilerde doğal olarak bulunan polifenolik sınıfa ait bir flavonoiddir. C6-C3-C6 omurgası üzerinde beş hidroksil grubuna ve piron halkası üzerinde 3-OH grubuna sahiptir. Flavonoidler, ROS'un temizlenmesi, antioksidan enzimlerin aktivasyonu, metal şelatlama aktivitesi, α - tokoferil radikallerinin azalması, oksidazların inhibisyonu yoluyla artan oksidatif stresi azaltarak serbest radikallerin neden olduğu hasarı önleyebilmektedir (21, 22).

Kuersetin gibi antioksidan özelliklere sahip bitkisel kaynaklı maddeler oksidatif strese bağlı hastalıkları azaltmak için alternatif bir ilaç kaynağı olarak kullanılabilirler. Yapılan çalışmalarda kuersetinin antioksidan, antiinflamatuvar, antiproliferatif, antikanserojenik özelliklere sahip olduğu dolayısıyla da sağlık açısından faydalı etkileri bulunduğu görülmüştür (23, 24). Kuersetinin meme, kolon (25), prostat (26), yumurtalık (27), endometrium, karaciğer ve akciğer tümörlerinin inhibisyonunda önemli roller üstlenebileceği bildirilmiştir (28). Ayrıca kuersetinin ovaryumda oosit kalitesini ve folikül gelişimini artırıp ovaryumda apoptozu azalattığına dair çalışmalar mevcuttur (29).

Gentamisin kadın genital enfeksiyonlarında da sıkça kullanılmasına rağmen literatürde ovaryum üzerinde yapabileceği etkilere dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, oksidatif stresi arttırıcı etkilere sahip olan gentamisinin ovaryum üzerinde oluşturacağı muhtemel hasarı belirlemek ve birçok çalışma ile antioksidan özelliğe sahip olduğu desteklenen kuersetinin koruyucu ya da tedavi edici etkinliğine dair fikir sahibi olmak amacıyla yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Ovaryumlar insan vücudunda çok fazla etkiye ve değişikliğe maruz kalan çok dinamik bir yapıya sahiptir. Yapısında farklı gelişim aşamalarında bulunan birbirleri ile parakrin etkileşim halinde olan foliküller yer alır (30).

Ovaryumun önemli görevleri; steroid hormonların üretimi, oositlerin döllenmeye hazır hale gelinceye kadar saklanması ve zamanı geldiğinde olgunlaşan oositlerin atılımı şeklinde sayılabilir. Ovaryum, östrojen biyosentezi için var olması gereken androjen substratı sentezleme özelliğine sahip granüloza ve teka hücreleri gibi özelleşmiş hücre tiplerine sahip ve folikülogenez için gerekli ortamı sağlayan, aktivitesi yüksek bir organdır (31).

2.1. Ovaryum Embriyolojisi

Embriyonik gelişimin gastrulasyon evresinden hemen sonra intermediate mezodermin farklılaşması ile ürogenital sistemin gelişimi başlar. Intermediate mezoderm, embriyonun dorsal vücut duvarından farklılaşan intermediyer mezenşimlerden ileri gelen, paraksiyal mezoderm ile lateral mezoderm arasında uzanan, büyük oranda ürogenital sistemin gelişiminden sorumlu embriyonik hücre tabakasıdır. Intermediate mezoderm çoğalıp farklılaşarak ürogenital kabartıları oluşturacak daha sonrasında bu yapılardan üriner ve genital sisteme ait yapılar oluşacaktır. Bu kabartıların nefrojenik kordonlarından üriner sistem gelişimi gerçekleşirken gonadal kabartılardan genital sistem gelişimi gerçekleşir (32).

Ürogenital kabartılar 4. haftanın sonuna doğru ortaya çıkan mezonefroz yapılarının ventromediyalinde, sölomik epitelin proliferasyonu sonucu alt kısımda yer alan mezenşimin kalınlaşarak oluşturduğu kabartılardır. Memelilerde gonadlar, erkeklerde Sertolini, kadınlarda granüloza hücrelerinin kökenini oluşturan ve steroidojenik aktiviteye sahip erkeklerde leydig hücrelerinin, kadınlarda teka hücrelerinin kökenini oluşturan iki tip somatik hücreden oluşur (33).

Gonad farklılaşması her iki cinsiyet için de birçok genin kilit rol oynadığı çok dinamik bir süreçtir. Embriyonun cinsiyeti spermin sahip olduğu eşey kromozomunun çeşidine bağlıdır. Y kromozomunun kısa kolunda yer alan ve testiküler farklılaşmayı belirleyen SRY (sex determining region on Y) geni 1990 yılında tanımlanmıştır (34).

SRY geni üzerinde yapılan birçok araştırma bu genin cinsiyet gelişimindeki rolünü, düzenleme mekanizmalarını ve diğer genlerle olan bağlantı ağını belirlemeye yönelik olarak yapılmış ve cinsiyetin belirlenmesinde bu genin varlığı ya da yokluğunun en önemli nedenlerden biri olduğu öne sürülmüştür. SRY geni varlığında TDF (testis belirleyici faktör) üretimi gerçekleşir; bu da testislerin gelişimde anahtar rol oynar. X kromozomunda SRY geni bulunmaz dolayısıyla dişi genital sistem oluşur (35). Ayrıca X kromozonu tarafından üretilen ve testis gelişimini inhibe edip yumurtalık farklılaşmasını aktive eden bir Z faktörünün varlığı da öne sürülmüştür (36). Bunun yanında Rspo1, Wnt4, Foxl2 genleri gonadal gelişimi dişi üreme sistemi gelişimi yönünde etkileyen önemli genlerdir (37). Dolayısıyla bir memeli fetüsündeki farklılaşmamış gonadlar bu ana genlerin ve bağlantılı birçok genin ifadesine bağlı olarak her iki cinsiyete de farklılaşabilme özelliğine sahip olup hassas bir denge ile kontrol edilen süreçten geçerler (38).

Genital kabartıların oluşumunda önemli işlevlere sahip genlerden bazılarını Lim homeobox9 (Lhx9) geni, Empty spiracles homeobox2 (Emx2) geni, steroidogenik faktör1 (sf1) geni ve Wilms tümör geni1 (Wt1) olarak sayabiliriz (39, 40). Farede tanımlanmış Lhx9 geni genital sırtların oluşumunun erken dönemlerinde ifade edilen transkripsiyon faktörlerini kodlar, eksikliğinde ya da yokluğunda sölomik epitelyumun proliferasyonunda kusurlar ortaya çıkmıştır (41). Emx2 geni farklılaşmamış gonad hücrelerinin korunmasında ve çoğalmasında önem arz eden genlerden birisidir (42).

Wt1 geni genital sırt oluşumunun en erken aşamalarından itibaren eksprese edilip embriyonik gelişimin çoğalma, proliferasyon ve apoptoz gibi birçok aşamasında DNA ya bağlanarak transkripsiyon kontrolü sağlayan genlerden birisidir (43).

Dişi genital organların gelişimde Wingless-related integration site (Wnt) gen ailesi büyük rol oynar. Buna örnek olarak yapılan bir çalışmada Wnt4 nakavt dişi farelerde Müllerian kanalların gelişmediği görülmüştür (44, 45). Wnt5a ekspresyonu baskılanmış dişi farelerde dış genital organların gelişmediği görülmüştür (46). Yine Wnt7a nakavt farelerde tuba uterinaların uterusu yapışık halde geliştiği, uterus düz kaslarının düzensiz olduğu ve epitelinin vajina epiteline benzer yapıda olduğu gözlenmiştir (47, 48).

Gonadal gelişimin önemli kısımlarından biri de gametleri oluşturacak olan erkeklerde testis, kadınlarda ovaryum gelişimini indükleyici role sahip primordiyal germ hücrelerinin oluşumudur.

Primordiyal germ hücreleri embriyonik gelişimin 2. haftasında oluşmaya başlayan bilaminar embriyonik diskin epiblast tabakasından köken alan, bir sonraki neslin genetik bilgi taşıyıcısı olabilecek, ilk etapta oogonia ve sonrasında oosite dönüşecek olan germ hücrelerinin öncülleridir. PGH'leri gelişimin 3. haftasında çevre yapılardan salgılanan transforme büyüme faktörü- β (TGF- β) sinyallerine karşın extraembriyonik endoderme yakın epiblastın proksimalinde oluşmaya başlar. Bu sinyallere yanıt için gerekli sinyal yolu ligantı Wnt3 proksimal epiblast hücrelerinde ifade edilir ve çevreden gelen sinyallere yanıt oluşturarak germ hücre spesifikasyonu için gerekli olan genlerin ekspresyonunu aktive eder (49, 50).

PGH'leri endodermal hücrelere nazaran daha büyük boyutlu, az organelli, berrak sitoplazmaya sahip ve alkalen fosfataz (+) boyanma özelliği olması ile gelişimin 3. haftasının sonuna doğru ayırt edilebilirler. Alkalen fosfataz, embriyonik kök hücrelerin hücre zarında bol miktarda bulunur ve PGH'nin pozitif boyanma özelliğine sahip olması bu hücrelerin çok sık mitoz geçirebileceğini gösterir (51). PGH'ler oluşup diğer hücrelerden ayırt edilir hale geldikten sonra gonadal sırta doğru ameboid hareketlerle aktif bir göç ve çoğalma dönemine girerler. Hücrelerin bu göçe hazırlık aşamasında enerji ihtiyaçlarını karşılayabilmek adına sitoplazmalarında glikojen partikülleri ve yağ damlacıkları birikimi görülür. Bu göç yolk kesesinin epitelinden başlayıp arka bağırsağın dorsal mezenterı boyunca ilerleyerek gonadal sırtlarda son bulur (52).

PGH'lerin gonadal sırtlara sorunsuz seşikle ulaşabilmesinde, hücre yüzeyinden ekspresse edilen hücre adhezyon proteini integrin $\beta 1$ aktif rol oynar. Yine göçün düzenlenmesinde; Stella, fragilis genleri ve kemik morfogenetik protein 4 (BMP4) geni aktif rol oynar (53). BMP-4 geninden kodlanan proteinler yenidoğan sıçanların yumurtalık foliküllerinin bazal membran ve stromal hücrelerinde yerleşim gösterdiği ve primordiyal foliküllerin aktivasyonunda pozitif yönde düzenleyici etkisi olduğu savunulur (54). PGH'lerin yüzeyini çevreleyen kalın glikokaliksine sahip olması göç sırasında hücre için koruyucu bir bariyer olmanın yanında hücreye antijenik özellik de kazandırır. PGH matriksinde bulunan fibronektinler hedef bölgeye ulaşmasında önemli rol oynayan moleküller arasındadır (55). Fertilizasyondan sonraki 7. haftanın başında, hücreler gonadal kabartılara ulaşmış olurlar. Farklı bölgelere göç eden primordiyal germ hücreleri genellikle apoptoza uğrarlar fakat apoptoza uğramayan az sayıdaki hücre teratoma sebep olabilir (56).

PGH'ler gonadlara ulaştıktan sonra sölomik epitelden köken alan düzensiz parmaklı uzantılar şeklindeki primitif cinsiyet kordonları oluşur. PGH'ler bu kordonlara yerleşerek gonadal kabartıların cinsiyete göre farklılaşmasını indüklerler. PGH'lerin yerleştiği kordonlar daha sonra düzensiz gruplar oluşturarak rete ovariyi oluştururlar. Bu yapı daha sonra dejenere olup kaybolurken yerini ovaryum medullasını oluşturacak olan vasküler stroma yapısı alır (57). Dişi gonadal gelişim 7-8. haftalar arasında sölomik epitelin proliferasyonu, altındaki mezenşimin kalınlaşması ve kortikal kordonların oluşumu ile devam eder. Kortikal kordonların gelişimi zamanla artar ve PGH ler bu kordonların içerisine yerleşir. Daha sonra bu kordonlar iyice gelişip sölom epitelinden ayrılarak her biri PGH lerin etrafını saran hücre birikintileri şeklinde kümelenirler. Sölom epiteli ile korteks arasında tunika albuginea adı verilen fibröz bir bağ doku oluşur. Sölom epitel hücrelerinin morfolojisi farklılaşarak germinal epitel adı verilen tek katlı kübik yapı kazanır (58).

Tüm bu gelişim evrelerinden sonra primordiyal germ hücreleri oogonyumlara, germ hücrelerini çevreleyen yüzey epiteli kökenli hücreler de ileride granüloza hücrelerini oluşturacak olan foliküler hücrelere dönüşür. Geçirdiği mitoz bölünmeler ile sürekli artmaya devam eden oogonia sayısı 8. haftada yaklaşık olarak 600.000 hücre civarındadır ve hızlı bölünmeden dolayı sitoplazmik köprüler ile bağlantılı haldedir (59). 8. haftadan sonra oogonyumların bir kısmı mayoz bölünmenin profaz evresine girer. Mayoza giremeyen oogonyumlar ileri haftalarda apoptoza uğrar. Oogonyumlar yaklaşık olarak 12. haftadan sonra oositlere dönüşmeye başlar. Oositlere farklılaşan hücrelerin, hücrelerarası bağlantıları azalır, alkalen fosfataz aktivitesi kaybolur ve hücreler mayoz I profazının diploten evresinde uzun yıllar tutuklu halde (dinlenme halinde) kalabilirler. 16. haftadan itibaren oositlerin etrafını folikül hücreleri tamamen çevreler ve oositler arası bağlantılar tamamen kaybolur (60). 20. haftada 6-7 milyona kadar ulaşan germ hücre sayısının üçte ikisi intramayotik primer oositlerden oluşurken üçte biri oogonyumlardan oluşur. Sonraki haftalarda artan oogonial atrezi ve 6. aydan sonra başlayan foliküler atrezi ile germ hücre sayısı düşüşe geçer (61). İnsan yumurtalığında (30 ila 60 µm çapında) primordiyal foliküller, tek katlı yassı granüloza hücresi tabakasıyla çevrili geç diploten evredeki primer oositten (9 ila 25 µm çapında) oluşur. Primer oositlerin gelişimi puberteye kadar etrafını çevreleyen folikül hücrelerinden salgılanan oosit matürasyon inhibitörü (OMİ) tarafından engellenir (62).

Embriyonik dönemin ürogenital farklılaşma öncesi döneminde mezonefrik (Wolfian) ve paramezonefrik (Müllerian) kanal adı verilen iki çift genital kanal bulunur. Mezonefrik kanallar lateral mezodermden gelişirler (63). Cinsiyet farklılaşmasının başlaması ile SRY genine sahip Y kromozomlu embriyolarda testis gelişimi başlar ve Sertoli hücrelerinden, Müllerian kanalların regresyonunu başlatan Müllerian inhibe edici hormon (MIS) salgılanır. Bu hormon paramezonefrik kanalların gerilemesini, erkek genital kanalların gelişimini ve dış genitallerin farklılaşmasını destekler (64). Dişi genital sistemine ait kanallar ise bu hormonların yokluğunda mezonefrik kanalların gerilemesi ve paramezonefrik kanalların gelişim göstermesi ile oluşur. Paramezonefrik kanallar sölom epitelinin invajinasyonu sonucu fertilizasyondan yaklaşık 2 hafta sonra gelişim gösterirler Paramezonefrik kanallar, kraniyel uçları periton boşluğuna açılan, pelvise kadar mezonefrik kanalların lateralinde paralel şekilde seyreden, pelviks bölgesinde mezonefrik kanalları çaprazlayıp kauda-kraniyal yönde kaynaşmış halde olan Y şekilli kanallardır (65).

Paramezonefrik kanalların, kraniyal parçalarından tuba uterinalar gelişir. Kaudalde birleşip uterovaginal kanalı oluşturan parçasından uterus ve vaginanın uterusu bakan 1/3 lük kısmı gelişir. Başlangıçta kaudal bölgede kabartı şeklinde olan birleşim bölgesinin merkezinde boşluk oluşmaya başlar. Bu boşluk ilk evrede septum ile ayrılmış haldeyken ilerleyen evrelerde bu septum kaybolur ve tek bir boşluk halinde gelişimine devam eder. Gelişimin ilerleyen evresinde uterusu, serviksi ve vaginanın vaginal fornix adı verilen 1/3 lük üst kısmını oluşturur (66). İlkel uterusun yapısı başlangıçta tek katlı küboidal bir epitel ile çevrilidir ve ilerleyen evrede yalancı çok katlı prizmatik epitele dönüşür. Bu epitelin altında, endometriyal stromayı ve çevresindeki miyometriyum tabakasını oluşturan yoğunlaşmış mezenşim bulunur. Uterusun endometrium ve miyometriyum tabakaları splanik mezenşimden gelişirler. Glandüler epitel, lümen epitelinden stromaya doğru uzanan tomurcuklar oluşturur. Gebeliğin 22. haftasında uterus gelişimi büyük oranda tamamlanmıştır. Doğumdan sonra plasentadan salgılanan östrojen ve progesteron seviyelerindeki hızlı düşüş ile endometriyum, birkaç küçük kalibreli bez ve zayıf vaskülarize bir stroma içeren atrofik bir duruma geriler (67).

Vaginanın bağ dokusu ve kasları mezenşimal kökenlidir. Vaginanın 1/3 lük kısmı paramezonefrik kanaldan geliştiği için mezenşimal kökenli iken, 2/3 lük alt kısmı ürogenital sinüsten gelişir ve epiteli endodermal kökenlidir.

Uterovaginal kanal, ürogenital sinüse doğru gelişim gösterdiği sırada ürogenital sinüs ile teması sağlandığında ürogenital sinüs hücreleri çoğalarak Müller tüberkülünü oluşturur (68). Gelişimin 9. haftasında Müller tüberkül hücreleri prolifer olup uterovaginal kanala doğru gelişim göstererek sinovaginal bulbusları oluştururlar. İlk evrede iki tomurcuk şeklindedir daha sonra birleşerek vaginal plağı oluştururlar. Vaginal plağın merkezindeki hücreler dejenere olur ve vagina lümeni oluşur. Oluşan bu kanalın dışa açılacak olan bölgesinde bir membran kalıntısı olarak himen bulunur (69).

2.2. Ovaryum Anatomisi

Dişi üreme sistemi konumları itibariyle iç genital organlar olarak tanımlanan; ovaryumlar, tuba uterinalar, uterus, vajina ve dış genital organlar olarak tanımlanan; labia majör, labia minör, klitoris, vestibül, vajina açıklığı, himen ve üretra ağzından oluşur (70).

İnsanlarda ovaryumlar, nispeten basık oval şekilli, 2,5 ila 5 cm uzunluğunda, 1,5 ila 3 cm genişliğinde ve 0,6 ila 1,5 cm kalınlığında olabilen bir çift organdır. Ovaryumları çepeçevre saran örtüye ligamentum uteri adı verilir. Bu örtü abdomeni çevreleyen periton yapısından kaynaklanır. Genital organları saran bu periton yapısı ağırlıklı olarak uterusu sardığı için ligamentum uteri adını alır. Bu periton yapısı ergenliğe kadar düz ve parlak yapıya sahipken ergenliğe geçiş ile birlikte yüzeyi pürüzlü ve mat bir görünüm kazanır (71).

Ovaryumlar arteria iliaca eksterna ile arteria iliaca interna arasında, pelvis minörün yan duvarlarında yer alan fossa ovarica denilen çukurumsu bölgede yerleşim gösterir. Ovaryumların yüzeyleri pelvis duvarına doğru bakan yüzeyi facies lateralis ve hemen mediyalindeki genital organlardan uterusu doğru olan yüzeyine facies medialis denir. Ovaryumun uç bölgeleri ise tuba uterinanın fibriyalarına bakan ucu ekstremitas tubaria, uterus duvarına bakan kısmı ise ekstremitas uterina olarak adlandırılır. Ovaryumun ekstremitas tubaria ucu fimbria ovarikaya tutunmuş halde bulunur. Ovaryumlar aynı zamanda bu bölgenin bir periton pilikası olan ve içerisinde ovaryuma giden sinirleri, damarları bulunduran ligamentum ovarii suspensoryum bağına tutunmuş haldedir. Ovaryumun ekstremitas uterina bölgesinde dışı ligamentum uteri ile sarılı, tuba uterinaların uterusu bağlandığı bölge olan kornu uteri bölgesine tutunan kuvvetli bağ yapısındaki ligamentum ovarii proprium bulunur. Bu yapı embriyonik dönemdeki fibröz kordon gubernakulum kalıntısıdır (72).

Ovaryumu saran peritonun sap kısmı margo mesovaricusa tutunur, diğer kısmın tutunduğu bir yer olmadığı için margo liber adını alır. Margo mesovaryumların içerisinde ovaryuma giren çıkan arterler, venler, sinirler ve lenfatiklerin bulunduğu hilum ovarii yapısı yer alır (73). Puberte öncesi dönemde ovaryumların en dış bölgesi skuamöz yapıda düz, parlak periton ile çevrilidir. Puberte ile birlikte ovaryum yüzeyi germinal epitel adı verilen tek katlı kübik hücreler ile çevrilerek mat, pütürlü bir görünüş kazanır. Hemen altında sert fibrötik bir yapıya sahip tunica albuginea tabakası yer alır (74).

Ovaryumun stroması, hilum ovarii haricinde tüm organı çevreleyen, farklı gelişim evrelerindeki folikülleri barındıran, organın esas fonksiyonel kısmını oluşturan korteksten ve damarların, sinirlerin, lenfatiklerin hilumdan organın içine doğru girdiği kısmı oluşturan medulladan meydana gelir. Korteks kısmı puberteden önce, en ilkel folikül yapısına sahip, tek katlı yassı epitel ile çevrili birincil oositten oluşan primordiyal foliküller içerirler (75).

Pubertenin başlangıcı ile birlikte folikül uyarıcı hormonun (FSH) etkisi ile gelişim döngüsüne giren küçük bir grup primordiyal foliküller, farklı büyüme aşamaları geçirerek Graaf folikülü halini alırlar (76). Yetişkin bir dişinin ovaryumları, salgıladığı hormonlar ile foliküllerin düzenlenmesi, korpus luteumun oluşması gerilemesi gibi olayları koordine eden benzersiz bir endokrinolojiye sahiptir (77). Graaf folikülü, ovumun olgunlaşıp dışarıya atılmasını sağlayan aynı zamanda hormon salgılayan en gelişmiş folikül yapısıdır.

Graaf folikülleri ovum salınımından önce yaklaşık 1 ila 1,5 cm çapına kadar ulaşabilir. Olgunlaşan folikül, tunica albugineaya bir basınç uygulayarak ovaryum yüzeyinde çıkıntı oluşturur. Hormonların etkisi ile iyice gelişen folikül, içerisindeki sıvının yaptığı basınç ile folikül duvarını patlatır ve birinci mayoz bölünmesini tamamlayıp mayoz ikinin metafaz evresine ulaşan ikincil oosit, etrafını çevreleyen corona radiata hücreleri ile birlikte folikülden salınır (78).

Ovum atıldıktan sonra folikül içi kanla dolar ve korpus hemorajikum adını alır. Geride kalan folikül artıkları sonrasında döllenme gerçekleşip gerçekleşmemesine bağlı olarak bir süre iç salgı bezi olarak görev yapan sarı renkli korpus luteum yapısını oluşturur. Döllenme gerçekleştiği takdirde korpus luteum varlığını hamilelik boyunca devam ettirir. Korpus luteum graviditatis adını alır ve yaklaşık 3 cm genişliğe kadar ulaşabilir. Döllenme gerçekleşmediği takdirde patlayan folikül kalıntısının oluşturduğu korpus luteum hızla küçülerek korpus luteum menstruasyonise dönüşür. Daha sonra bu yapı da dejenere olarak korpus albicans adı verilen küçük nebde halini alır (79).

Tuba uterinalar, yaklaşık olarak uzunluğu 10 cm, genişliği 3 mm olan, erkek genital organ sistemindeki appendiks testis yapısına karşılık gelen, her bir seviyede farklı kalınlıklarda lümeneye sahip tüp şeklindeki organdır. Etrafı ligamentum latum uteri ile çepe çevre sarılı haldedir. Tuba uterinalar distal uçtan proksimale doğru; fimbria, infundibulum, ampulla, istmus ve intramural segment olarak dört bölümde incelenir (80).

- İnamural segment 0,9 ila 1,7 cm uzunluğunda tuba uterinanın uterus ile birleştiği kısa ve dar bir alanı temsil eder.
- İstmus bölümü, intramural segmentin devamında gelen yaklaşık 3 cm kadar uzunluğundaki, kaslı bölümdür.
- Ampulla bölümü, yaklaşık 7 cm uzunlukta, 5 ila 10 mm genişliğinde, lümeni kıvrımlı yüzeye sahip, döllemenin gerçekleştiği esas bölümdür.
- İnfundibulum, tuba uterinaların uçlara doğru bir huni gibi genişleyen kısmını ve periton boşluğuna açık halde ovaryumun bir kısmını örtü gibi saran fimbria adı verilen çıkıntılı yapıları içerir (81).

Ovaryumlar yumurta salınımını periton boşluğuna gerçekleştirdikten sonra salınan yumurta fibrialar tarafından yakalanır ve uterusu taşınır. Tuba uterinanın epitelindeki siller dalgalanma hareketi yaparak, ovaryumlardan salınan yumurtayı periton boşluğundaki sıvı ile birlikte tüpün içine doğru yönlendirir (82).

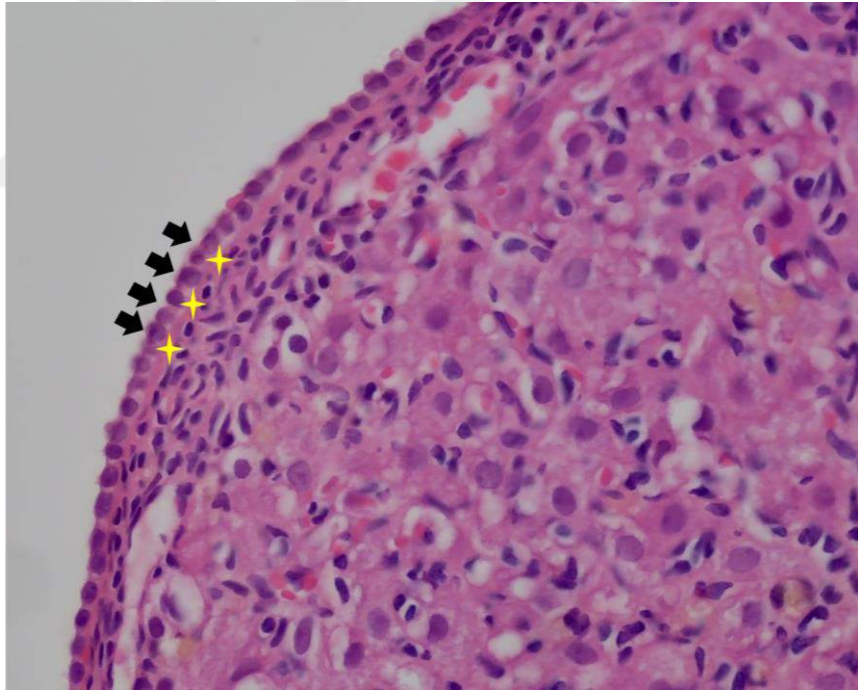
Uterus kadın genital sistemin en büyük, en kaslı ve genişleyebilen organıdır. Uzunluğu yaklaşık 7,5 cm, genişliği 5 cm ile 2.75 cm arasındadır. Abdominal kısmından tuba uterinalara açılan, pelvik kısmında ise vajinaya komşu, armut şeklindeki içi boş ve kalın duvarlara sahip, mesane ile rektum arasında konumlanmış bir organdır. Uterus yapısal ve fonksiyonel farklılıklar bakımından iki bölgeye ayrılır (83).

Korpus uteri, uterusun 2/3 lük üst kısmını, esas gövdeyi oluşturan bölümdür. Korpus uterinin, tuba uterinaların bağlandığı düzlemin üstünde kalan bölümü fundus uteri olarak adlandırılır. Fundus uteri konveks yapılı dış yüzeyi periton ile çevrili, ince bağırsak kıvrımlarına komşu, tuba uterinaların uterusu bağlandığı bölgeler kornu uteri dekstrum ve kornu uteri sinistrumları barındıran en geniş uterus kısmıdır. Bu iki uterus bölümü arasında dar bir geçiş bölgesini temsil eden istmus uteri bölümü bulunur (84).

Cervix uteri uterusun vajina ile komşuluğu bulunan 1/3 lük alt bölümü olup yaklaşık 2 cm uzunluğundadır. Canalis cervicis uteri adı verilen boşluk ile uterusu vaginaya bağlar. Bu boşluğun duvarında pilikalı çıkıntılar bulunur.

2.3. Ovaryum Histolojisi

Ovaryum dış yüzeyi germinal epitel adı verilen tek katlı yassı ya da kübik epitel ile çevrilidir. Bu epitelin hemen altında ovaryuma açık grimsi görünüm kazandıran, fibröz sıkı bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea tabakası yer alır (Resim 1). Tunika albuginea tabakasının altında folikülleri ve folikül etrafındaki stromal hücre tabakasını kapsayan ovaryum korteksi bulunur. Kortikal bölgenin devamında büyük kan damarlarını, lenf damarlarını ve sinirleri içeren bir bağ dokusu olan ovaryum medullası yer alır (85). Folikül gelişimi, çoğunlukla ovaryum apikale yakın kortek bölümünde yerleşim gösteren primordiyal foliküllerin uyarılması ile başlar.



Resim 1. Ovaryum dış yüzeyini çevreleyen germinal epitel (siyah ok) ve hemen altında yer alan soluk pembe boyalı tunika albuginea (sarı yıldız) görülmektedir (H&E 400X).

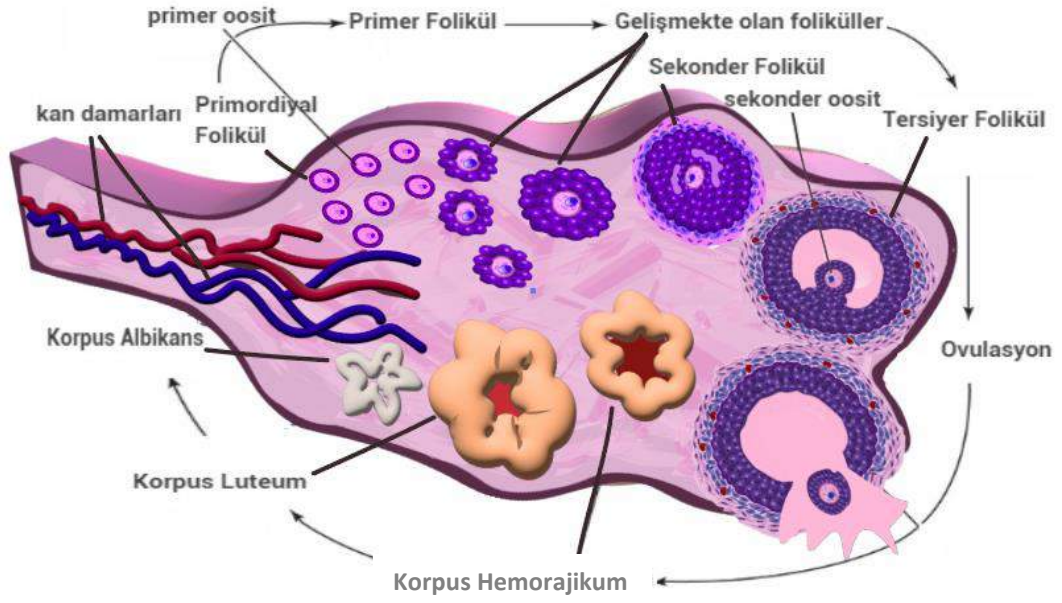
2.3.1 Ovaryum Folikül Gelişimi

Dişilerde puberteden sonra hipotalamus, hipofiz ve ovaryan regülatörlerin aktivitelerinin fonksiyonel ve zamansal uyumu ile her 28-30 günde bir tekrarlayan folikül gelişimi ve bunun sonucunda ovulasyon gerçekleşir (86).

Bu döngü ilk olarak hipotalamustaki gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) etkisi ile sentezi uyarılan folikül uyarıcı hormon (FSH) ve Lüteinizan hormonun (LH) hipofizin portal venöz sistemine pulsatil sekresyonu ile başlar. Dolaşıma salgılanan bu hormonlar, ovaryumdaki foliküllerin gelişimi, ovulasyon, korpus luteum oluşum aşamalarında aktif rol alırken estradiol, progesteron, inhibin A, inhibin B gibi ovaryan regülatörlerin sekresyonunu uyarır (87).

Folikülogenez, folikül gelişimi ile ilgili reseptörlere doğrudan etki eden yumurtalık steroid hormonları ve dolaylı olarak çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerin aracılığı ile düzenlenmiş programlı bir döngüdür. Oosit maturasyonu da folikülogenez ile uyum içinde gerçekleşir (88). Dişilerde folikül gelişimi ile başlayan süreç, yumurtlama, korpus luteum oluşumu ve regresyonu şeklinde devam eden ve tekrar eden bir döngü şeklindedir (Şekil 2). Bu gelişimin evreleri şu şekilde sıralanabilir:

- 1) Primordiyal foliküllerin uyarılması
- 2) Primer folikül oluşumu
- 3) Sekonder folikül oluşumu
- 4) Graaf folikül oluşumu
- 5) Ovülasyon
- 6) Korpus Luteum oluşumu



Şekil 1. Folikülogenez şematik çizimi

Şekil 1’de ovaryumdaki folikül gelişiminin primordiyal folikül aşamasından başlayarak Graaf folikülüne kadar olan evreleri gösterilmiştir. Ovulasyon sonrası folikülün korpus luteuma dönüşümü de resmedilmiştir.

Primodriyal folikül havuzunun olgun oosit üretimi için gonadotropinlerle aktive edilmesi sonucu bazı foliküllerin gelişim süreci başlar. Folikül gelişim sürecinin başarılı bir şekilde yürütülmesi için folikül içerisinde bazı koordineli değişimler meydana gelir. Granüloza hücreleri ile oosit arasında çeşitli iyonların, aminoasitlerin, hormonların ve oositin nükleer maturasyonunu düzenleyen sinyallerin geçişine izin veren oluklu bağlantılar yer alır. Büyüme evresine girmemiş haldeki foliküllerin oosit kromozomları kondanse halde bulunurlar ve büyüme aşamasına geçiş yapan folikülden salgılanan proteinler ve sinyaller aracılığı ile uyarılır (89).

Erken evrede folikül ile oositin koordineli gelişimini sağlayan bağlantılardan birisi de granülozadan salgılanan kit ligand ile oositte ekspresse edilen C-kit reseptörünün etkileşimidir. Primer folikül aşamasında, ZP1, ZP2, ZP3 adlı glikoproteinlerin sentezi ile granüloza ve oosit arasında zona pellusida yapısı oluşur (90). Sekonder folikülün gelişimine kadar olan süreçte folikül etrafını çevreleyen granüloza hücrelerinin çok tabakalı hale gelmesi ile folikülün çevresindeki korteks stroma hücreleri prolifer olup bazal membranın dışını saran teka interna ve teka eksterna adı verilen tabakalar oluşur.

Teka tabakasının oluşması ile gonadotropinlere karşı verilen steroidojenik cevabın artışı sağlanır. Teka tabakası içerisinde bolca kılcal damar bulundurur ve bu da ovaryan regülatörlerin foliküle ulaşmasını kolaylaştırır, ayrıca teka hücrelerinden östrojen biyosentezi için gerekli andojenler sentezlenir. Sekonder folikül aşamasına kadar gerçekleşen değişimler gonadotropinden bağımsızdır. Antrumun tamamıyla oluşması ile birlikte granüloza hücrelerinde hem morfolojik olarak hem de fonksiyonel olarak bir farklılaşma gerçekleşir (91). Folikülün iç yüzeyinde oosit ile bağlantısını devam ettiren transzonal uzantılı hücrelere kümülüs hücreleri adı verilir. Folikül çevresinde yeralan granüloza hücreleri de mural granüloza hücreleri (MGH) olarak adlandırılır. Östrojen sentezini sağlarlar (92). Yapılan bir çalışmada, sıçanlara GnRH antagonisti uygulanarak aynı zamanda hipofizektomi gerçekleştirilmiş; sonuç olarak bu sıçanlarda folikül gelişiminin azaldığı, ovaryum ağırlıklarında düşüş olduğu saptanmıştır (93).

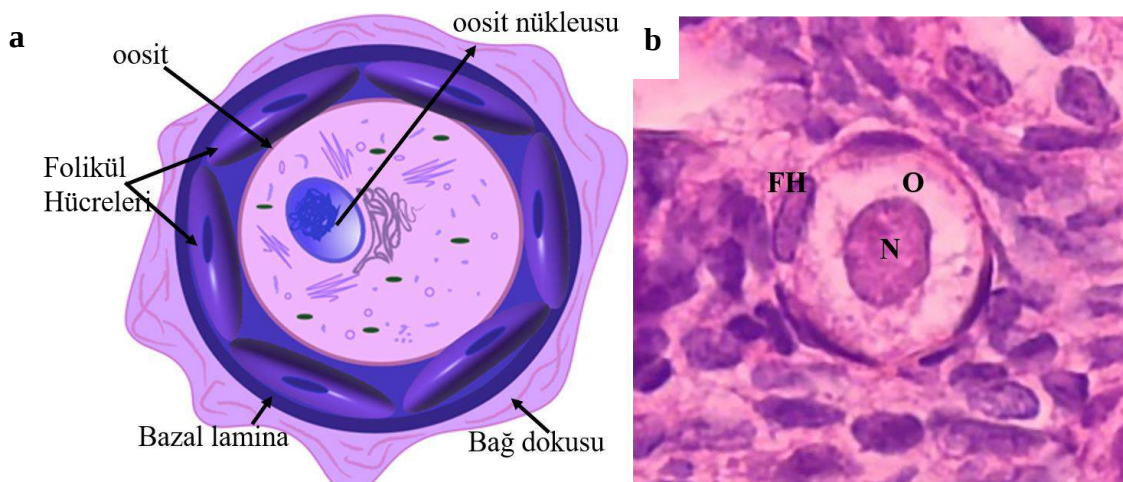
Tüm bu gelişim evrelerini sorunsuz şekilde tamamlayan folikül ovulasyon öncesi son halini almış olur. Bu foliküller Graaf folikülü olarak adlandırılır. Graaf folikülü histolojik görüntülemelerde tamamen oluşmuş bir antrum ve antruma doğru çıkıntı yaban kumulus oofurus yapısı içerisinde korona radiata hücreleri ile çevrili oosit şeklinde ayırt edilir. Antrumun etrafını granüloza hücreleri çevreler ve dışındaki teka tabakaları tamamen oluşmuş haldedir. FSH etkisi ile gelişen granüloza hücrelerinde östrojen üretimi artar ve LH salınımı uyarılır. Progesteron, prostaglandinleri, proteolitik enzimleri aktive eder follikül duvarındaki kollajen parçalanır, kumulus oofurus folikülden ayrılır ve yumurta korona radiata hücreleri ile birlikte ovaryumdan serbest bırakılır (94). Ovulasyon gerçekleştiren folikül kalıntıları korpus hemorajiküm oluşturur. İlerleyen zamanda corpus luteum ve korpus albikansa dönüşür. Gelişmekte olan diğer foliküller baskılanarak dejenere olur ve ovaryum bağ dokusunda korpus atretikumu oluştururlar. Ovulasyondan hemen önce oosit ikincil oosit halini alır ve ovulasyon ile periton boşluğuna salınır (95).

Fimbrialar ve infundibulum epitelleri, fallop tüpündeki en yoğun siliyer epitele sahip kısımlardır. Yumurtlama sırasında fimbrialardaki bu sillerin uyumlu süpürücü hareketleri sayesinde periton boşluğuna bırakılan yumurta, ince, kaslı ve kıvrımlı mukoza tabakasına sahip ampullaya ulaştırılır. Daha sonra düz kaslarla çevrili diğer bir sfinkter görevi gören bölgeye intramural segmente ulaşır. Bu bölgelerdeki kasların hareketi adrenerjik innervasyon, steroidler ve prostaglandinlerce düzenlenir (96, 97).

Tuba uterinanın farklı bölgelerinin düz kas katmanları longitudinal ve sirküler olarak birbirinden ayırt edilebilir ancak ampulla bölgesindeki kaslar farklı bir organizasyona sahiptir. Bu bölgedeki kaslar ardı sıra dizilmiş, iç içe geçmiş ve farklı yönlere dallanma gösteren rastgele dağılımlı düz kas demetlerinden oluşur. Erken embriyo tarafından salgılanan human korionik gonadotropin (hCG) hormonu tubal epitelde mRNA ekspresyonunu başlatıp tubal sfinkterlerin açılmasına yardımcı olan faktörlerin üretimini destekleyici etki gösterebilir (98).

2.3.2. Primordiyal Folikül

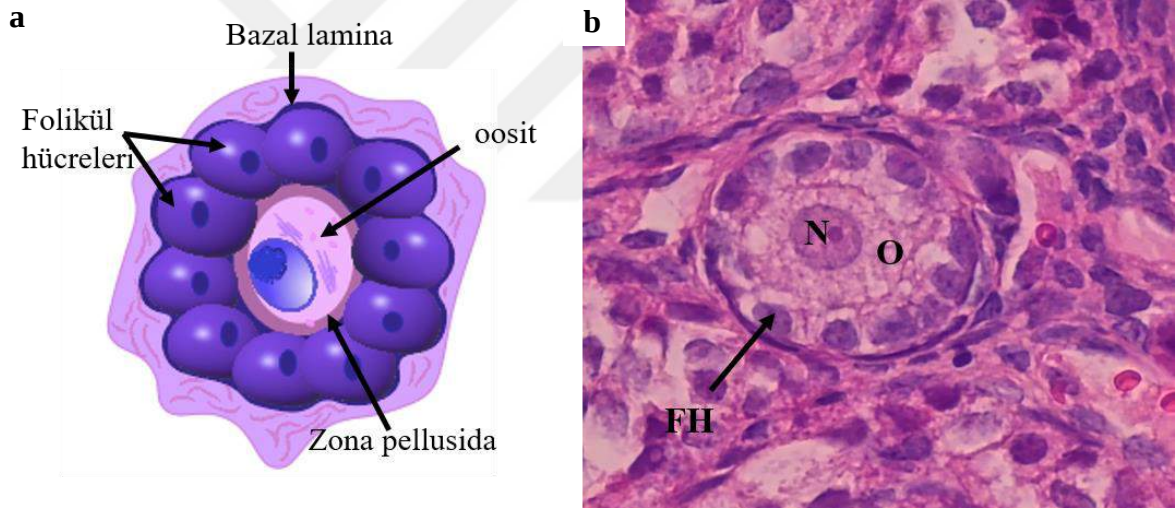
Ovaryumlarda embriyonik gelişimin 12. haftasında tam formunu kazanan, doğumla birlikte ilkel folikül havuzunu oluşturan, mayoz I de tutuklu oosit ve oositi çevreleyen tek katlı yassı pregranüloza hücrelerine sahip foliküllere primordiyal folikül adı verilir (Şekil 2). Ovaryumun korteksinde daha çok germinal epitele yakın kısımlarda yoğunluk gösterirler ve korteks stroması ile pregranüloza hücreleri arasında sınır oluşturan bir bazal laminaya sahiptir. Primordiyal foliküller aktifleşme sinyalini alana kadar uyku halinde kalırlar. Primordiyal foliküllerin üç olası kaderi vardır: uyku halinde kalmak, gelişime başlayıp herhangi bir evrede atreziye uğramak ya da gelişimini tamamlayıp yumurtlamayı gerçekleştirmektir (99). Primordiyal foliküller erken büyüme fazına girmek için aktifleştiği zaman oosit büyümeye başlar ve oositi çevreleyen yassı pregranüloza hücreleri küboidal forma dönüşürler.



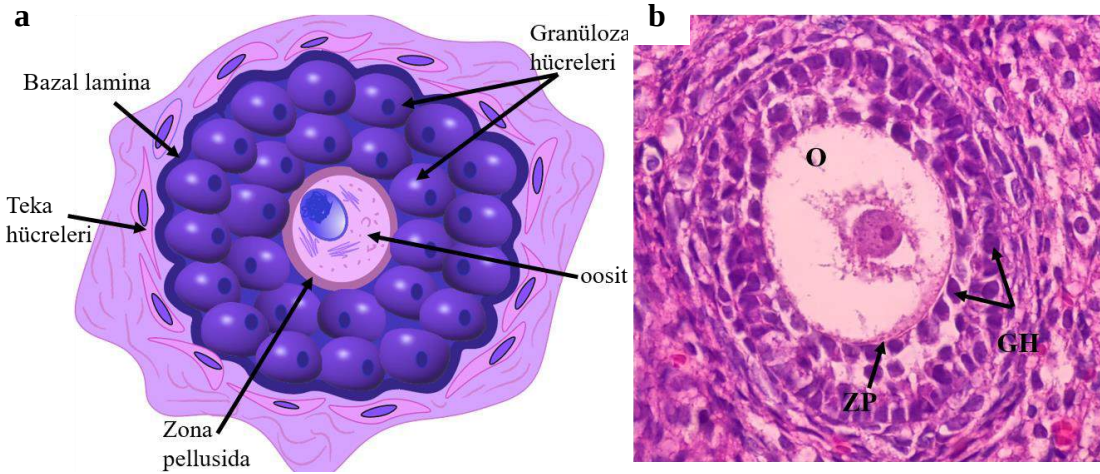
Şekil 2. Primordiyal folikülün şematik çizimi. (a) Bağ dokusundan bazal lamina ile ayrılan yassı şekilli folikül hücreleri ve çevrelediği birincil oosit resmedilmiştir. (b) Primordiyal folikülün ışık mikroskop görüntüsünde yassı foliküler hücreler (FH), oosit (O) ve oosit nükleusu (N) görülmektedir (H&E 400X).

2.3.3. Primer Folikül

Primer foliküller, primordiyal foliküllerin aktifleştikten sonraki gelişim sürecinin ilk evrelerinde oluşan folikül çeşididir. İlk aşamada oluşan oositi çevreleyen tek katlı kübik hücreler ile çevrili folikül yapısı unilaminar primer folikül olarak adlandırılır (Şekil 3). Erken folikül büyümesi granüloza hücrelerinin proliferasyonu ile kübik yapı kazanmasını, granüloza hücrelerini çevreleyen bir bazal membran oluşumunu ve büyümekte olan oositin salgılanan ZP-1, ZP-2, ZP-3 glikoproteinlerinin bir araya gelmesiyle zona pellusida yapısının oluşumunu içeren süreçtir. Bu süreçte oosit hücresi yoğun metabolik aktiviteye sahiptir (100). Salgıladığı glikoproteinlerden ZP-3 sperm bağlanma reseptörü olarak işlev görürken, aynı zamanda akrozom reaksiyonunu indükleyici etkiye de sahiptir. Zona pellusida asidik yapıya sahiptir ve Periyodik Asit-Schiff (PAS) boyası ile parlak pembe renkte boyanma gösterir (101).



Şekil 3. Unilaminar primer folikül şematik çizimi. **(a)** Foliküler hücrelerin yassı formdan kübik forma geçtiği ve zona pellusida yapısının oluşmaya başladığı resmedilmiştir. **(b)** Unilaminar folikülün IM görüntüsünde oositi (O) çevreleyen tek sıralı kübik foliküler hücreler (FH) gösterilmektedir.



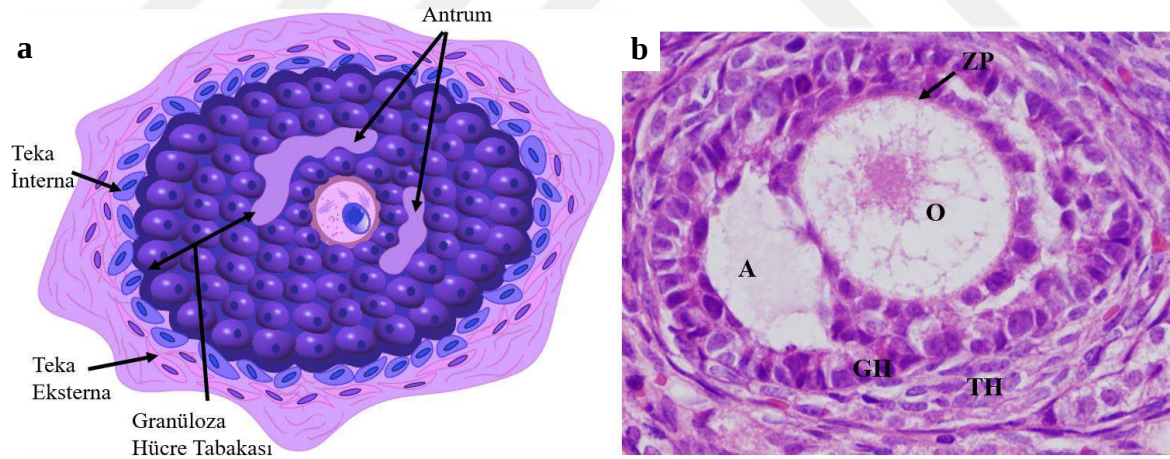
Şekil 4. Multilaminar primer folikül şematik çizimi. **(a)** Folikül hücrelerinin çok tabakalı granüloza hücrelerine dönüştüğü ve bu evrede bazal lamina etrafındaki teka hücrelerinin oluşmaya başladığı resmedilmiştir. **(b)** Multilaminar primer folikülün IM görüntüsünde oosit (O)'i çevreleyen zona pellusida (ZP) yapısı ve etrafındaki çok tabakalı granüloza hücreleri (GH) görülmektedir (H&E 400X).

Primer folikül başlarda tek katlı kübik pregranüloza hücreleri ile çevrili halde unilaminar primer folikül adını alır. Zamanla oositi çevreleyen folikül hücreleri prolifer olup hızlı bir şekilde mitotik bölünme gerçekleştirirler. Mitotik bölünmeler sonucu çok katlı hücre tabakası oluşur ve artık granüloza hücreleri olarak adlandırabileceğimiz hücreler ile çevrili bu folikül yapısına multilaminar primer folikül adı verilir (Şekil 4).

Granüloza hücreleri arasında oluklu bağlantılar bulunur. Folikül gelişimi ve oositin büyüüp olgunlaşması için gerekli besinler, makro ve mikromoleküller medulladaki kan damarlarından geçip folikül sıvısı aracılığıyla gerekli bölgelere ulaştırılır. Bu evreye kadar olan folikül gelişimi gonadotropinlerden bağımsız olarak gerçekleşir. Foliküldeki büyüme ile granüloza hücrelerinden salgılanan Teka diferansiyasyon Faktörü (TDF) çevre dokudaki stromal hücrelerin proliferasyonunu uyarıp teka folikülü olarak adlandırılan bir bağ doku farklılaşması gerçekleştirir. Teka öncül hücreleri TDF ile uyarıldıktan sonra LH reseptörü ve steroidojenik enzimlerin mRNA düzeyindeki ekspresyonunu başlatır. Folikülü çevreleyen bu fibroblast benzeri stromal hücrelerden gelişen teka tabakası fonksiyonel açıdan farklı işlevlere sahip iki tabakada incelenir. Folikülün granüloza hücrelerini çevreleyen bazal laminanın komşuluğunda olan bölümü teka interna olarak adlandırılırken, ovaryum stroması ile komşuluğu olan bölümü teka eksterna olarak adlandırılır. Granüloza tabakası avasküler yapıdadır ve kapillerlerden zengin teka interna tabakası ile arasında bazal lamina ile belirgin bir sınır oluşturur (102).

2.3.4. Sekonder Folikül

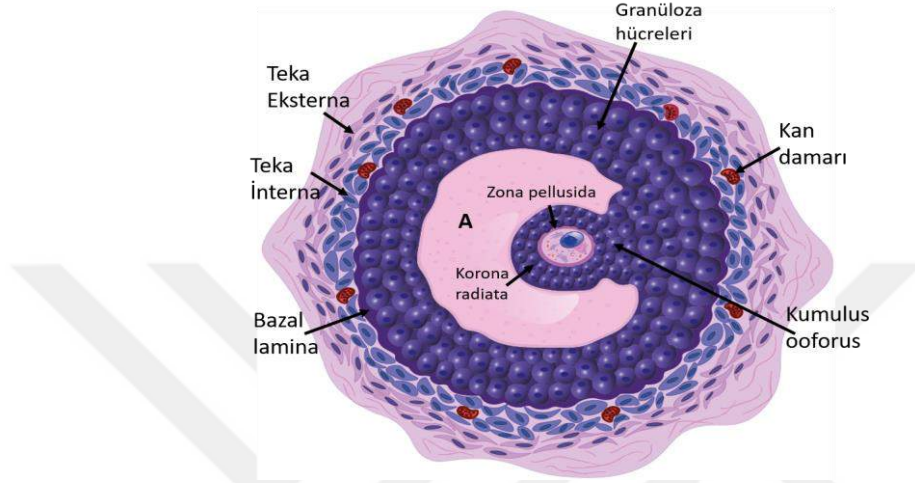
Granüloza hücrelerinin gittikçe çoğalması sonucu hücre tabakaları artmaya başlar ve 6 ila 12 hücre tabakasına ulaşıncaya, hücreler arası sıvı dolu boşluklar oluşmaya başlar. Bu boşluklar hiyaluronan bakımından zengin likör folikülü olarak oluşmaya başlar, daha sonra genişleyerek birleşir ve tek bir kaviteye dönüşür (Şekil 5). Bu aşamadan sonra folikül gelişimi, teka tabakalarının oluşması ile hem ovaryan regülatörlerinin foliküle geçişinin kolaylaşması hem de gonadotropinlere karşı steroidojenik tepkinin artması dolayısıyla farklı bir boyut kazanır. Bu büyümenin inhibisyonu granülozadan salgılanan oosit maturasyon inhibitörü (OMİ) ile sağlanır. Folikül boyutu arttıkça granüloza hücrelerinin arasındaki kavite de genişler ve kaviteye doğru oosit ve onu çevreleyen granüloza hücreleri çıkıntı oluşturur. Bu çıkıntıya kumulus ooforus adı verilir. Oositin etrafını çevreleyen granüloza hücrelerine korona radiata denir. Korona radiata hücreleri mikrovillusları ile oosit mikrovillusları zona pellusidaya penetre olmuştur ve bunlar arasında oluklu bağlantılar bulunur. Korona radiata hücreleri dışında kumulus ooforus hücreleri bulunmaktadır. Korona radiata, ovulasyonda yumurta ile birlikte folikülden salınan hücre grubudur (103).



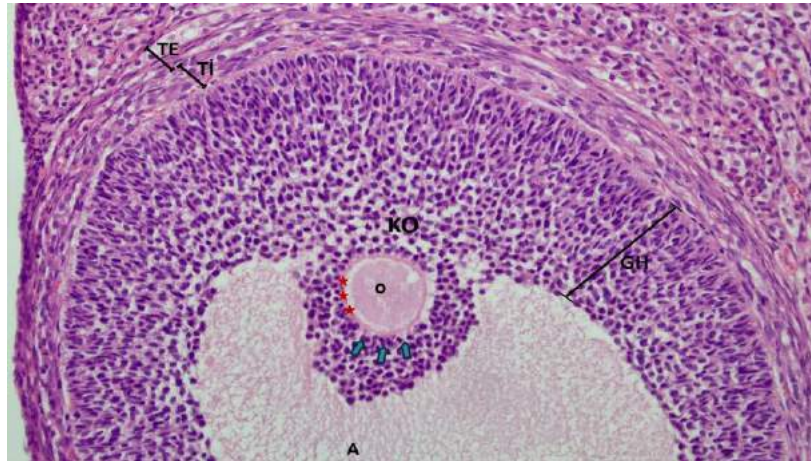
Şekil 5. Sekonder folikül şematik çizimi. **(a)** Granüloza hücre tabakalarının arasında antrum (A) oluşumu ve teka tabakalarının kendi içinde teka interna, teka eksterna şeklinde iki tabakaya ayrıldığı resmedilmiştir. **(b)** Sekonder folikülün IM görüntüsünde granüloza hücreleri (GH) etrafındaki teka hücreleri (TH) ve antral (A) boşluklar görülmektedir (H&E 400X).

2.3.5. Graaf Folikül

Graaf folikülü, foliküler sıvı ile dolu büyük antral boşluğu tamamen oluşmuş, teka tabakaları en belirgin halini almış ovulasyon öncesindeki en gelişmiş folikül yapısıdır (Şekil 6, Resim 2).



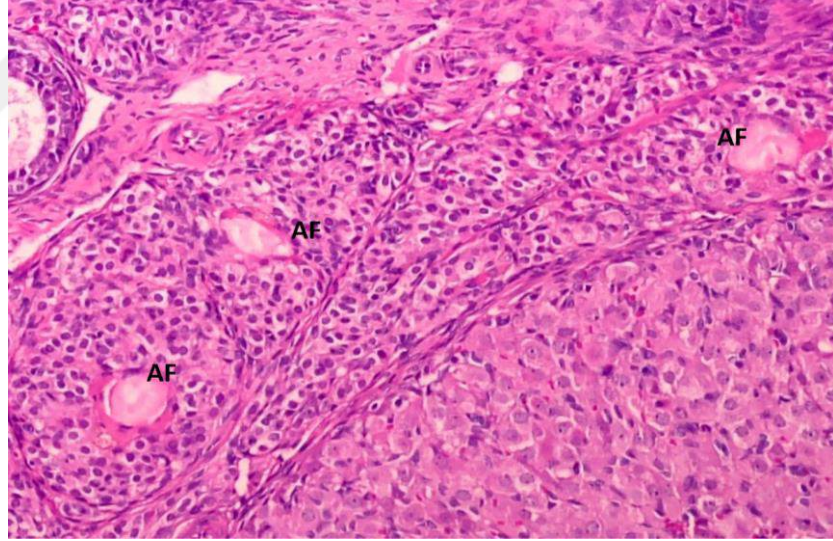
Şekil 6. Graaf folikül şematik çizimi. Çok tabakalı granüloza hücrelerinin ortasında yer alan foliküler sıvı ile dolu antrum yapısı, bu boşluğa doğru çıkıntı oluşturan kumulus ooforus yapısı ve oositi çevreleyen korona radiata hücreleri resmedilmiştir. Bazal membranı çevreleyen teka tabakaları ve teka interna tabakasının kan damarından zengin oluşu da şekilde gösterilmiştir.



Resim 2. Graaf folikül. Oosit (O) etrafını çevreleyen kırmızı yıldızla işaretlenmiş soluk pembe zona pellusida görülmektedir. Oositin etrafındaki hücre topluluğu (mavi oklarla belirtilmiş) korona radiata, antruma (A) doğru çıkıntı yapan granüloza hücre kitlesi kumulus ooforus (KO), folikülü çevreleyen granüloza hücre tabakası (GH), tüm folikülü çevreleyen teka interna (Tİ) ve teka eksterna (TE) yapıları görülmektedir (H&E 400X).

2.3.6. Atretik foliküller

Yumurtalık rezervi doğumdan itibaren doğal olarak ya da dış etkenlerle kademeli olarak tükenir. Foliküller henüz gelişim aşamasına girmeden ya da gelişiminin herhangi bir aşamasında foliküler atrezi denilen bir süreçle dejenere olarak kaybolurlar (Resim 3). Foliküllerin gelişimini takip eden süreçte atreziye uğramasının birçok nedeni bulunur; hasarlı genom ve organel içeren düşük kaliteli oositlerin yer aldığı foliküller atreziye uğrayıp elimine edilir (104). Yeterli derecede granüloza hücrelerine sahip olmayan foliküller de oositin beslenmesi ve folikülün gelişimde yetersiz kalması sebebi ile elimine olan grupta yer alırlar (105). Yumurtalık rezervinde yer alan sağlıklı oositlerin mevcudiyetini azaltan faktörler arasında çeşitli enfeksiyonlar sebebiyle yaşanan iltihaplanma ve sonrasında kullanılan ilaçların yan etkileri de gösterilebilir. Foliküler atrezi ilk olarak granüloza hücrelerinin apoptoza uğraması ile kendini gösterir. Daha sonra foliküllerin oositleri küçülerek dejenerasyona uğrar (106).



Resim 3. Atretik folikül. Ovaryum dokusunda soluk pembe camsı yapıdaki atretik folikül (AF) görülmektedir.(H&E 200X)

2.4.Gentamisin

Gentamisin ilk olarak *Micromonospora purpurea* bitkisinden 1963 yılında izole edilmiş, gentamisin C1,C2 ve C1a karışımı halinde elde edilen, düşük maliyetli, geniş kullanıma sahip bir aminoglikozittir. Moleküler formülü $C_{21}H_{43}N_5O_7$ dir (107).

Gentamisin gram negatif, aerobik bakterilerin 30S ribozomal alt birimlerinde yer alan 16S rRNA ve S12 proteinlerinin arasına yerleşerek translasyonda mRNA'nın yanlış okunmasına sebep olur ve bu sayede bakteriyel protein sentezini engelleyerek bakteriyel hücre zarının bütünlüğünün bozulmasına yol açar (108). Mantar, virüs ve anaerobik bakterilere karşı etkinlikleri yoktur. Gentamisin, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* gibi bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar da dahil ciddi gram negatif enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir (109, 110). Gentamisin klinikte sıkça kullanılan tedavi edici ajan olmasının yanı sıra nefrotoksisite ve ototoksisite gibi ciddi yan etkilere sahiptir. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda gentamisinin sperm canlılığında azalmaya, testis dokusunda histopatolojik etkilere ve testiste apoptotik hücre artışına sebep olduğu görülmüştür (111).

2.4.1. Gentamisin Etki Mekanizması

Gentamisin hedef bakterilere girişi üç aşamada gerçekleşir. İlk aşamada polikationik aminoglikozit olan gentamisin, gram negatif bakterilerin hücre zarlarında bulunan lipopolisakkaritler, fosfolipitler gibi negatif yüklü bileşenlere elektrostatik olarak bir bağlanma fazı geçirir. Bu bağlanma sonucunda membran geçirgenliği artarak gentamisinin sitoplazmaya girişine izin verir. İkinci aşama antibiyotiğin bakteri sitoplazmasına girişi ve bakteriyel ribozomun 30S alt birimine bağlanma evresidir. Bu evreden sonra bakterinin protein sentezi bozulur ve sitoplazmik membran hasarı oluşur. Üçüncü aşama aminoglikozitler tarafından protein translasyonu bozulan ve bunun sonucunda membran hasarı gerçekleşen bakteriye daha fazla aminoglikozit girişi gerçekleşip konsantrasyona bağlı ölümün gerçekleştiği aşamadır (112).

2.4.2. Gentamisin Toksisitesi

Gentamisinin nefrotoksisite ve ototoksisiteye sebep olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (113). Başlıca hedef organları böbrekler ve kranial sinirlerdir. Bunların dışında oksidatif stresi arttırıcı etkiye sahip olup birçok organ içinde tehlike arz eden bir ajandır (114). Üreme organlarında oluşturabileceği hasara dair yapılan çalışmalarda testis üzerinde olumsuz etkilere sebep olduğu ve sperm parametrelerini değiştirdiği görülmüştür (115). Gentamisinin ovaryumda oluşturabileceği hasara dair herhangi bir *in vivo* çalışmaya rastlanmamıştır.

2.5. Oksidatif Stres

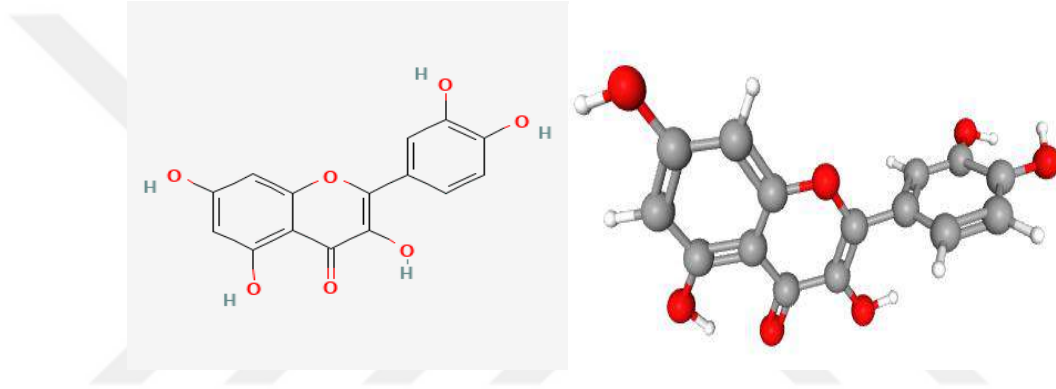
Oksidatif stres, biyolojik bir sistemde üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) reaktif ara ürünlerinin detoksifiye edilmesinde yetersiz kalması sonucu çok yönlü hasara sebep olabilecek bir dengesizlik durumudur. Serbest radikaller, vücutta birçok reaksiyon sonucu ortaya çıkabilen, dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron taşıyan ve bu kararsızlık sebebiyle vücuttaki diğer moleküller ile reaksiyona girip sistemde dengesizlik yaratma potansiyeline sahip yüksek enerjili moleküllerdir. Bu moleküllerin oluşmasına sebebiyet veren şeyler arasında vücudun kendi elektron transport sistemi, radyasyon ve dışardan alınan ajanları sayabiliriz (116). Vücuda alınan ilaçlar metabolize edilirken çeşitli redoks tepkimeleri geçirir ve bu tepkimeler sonucu serbest radikaller ortaya çıkar.

Vücutta biriken serbest radikaller vücudun kendi antioksidan sistemi tarafından ya da dışarıdan takviye edilen antioksidanlar tarafından maskelenemezse vücutta birçok sisteme zarar verip sitotoksisite, apoptoz, nekroz ve DNA mutasyonlarına sebep olabilir (117). Oksijenli solunum yapan canlılarda mitokondriyal metabolizma sonucu ROS'un ortaya çıkışı normal bir durumdur ama oluşan serbest radikaller ya kararlı hale dönüştürülür ya da maskelenerek sistemde nötralize edilirler. Hücrelerde serbest radikallerin nötralizasyonunu gerçekleştiren endojen enzim sistemleri bulunur. Hücrenin bu doğal antioksidan sistemini oluşturan başlıca enzimlere örnek olarak SOD, CAT, GPx gösterilebilir (118). Normal durumlarda ROS ürünleri genellikle, vücudun antioksidan savunma sistemi olan, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ile temizlenir fakat bu sistemlerin üretimindeki ya da işleyişindeki aksaklıklar ortamdaki süpürücü enzimlerin tükenmesine sebep olabilir. Bunun sonucunda vücudun dengesi prooksidan lehine kayar ve serbest radikallerin nötralize edilememesi ile diğer hücresel kompartmanlar zarar görebilir (119). Bu enzimlerin seviyelerindeki artış ya da azalış bize oksidatif dengenin bozulup bozulmadığını gösteren biyobelirteçtir. Oksijen radikallerinin doku bileşenleri ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan metabolitler de bize oksidatif stres seviyesi hakkında fikir sağlar. Malondialdehit (MDA) hücre zarında doymamış yağ asitlerinin oksidasyon reaksiyonunun son ürünüdür. Bu nedenle oksidatif stres biyobelirteçleri arasında yer alır (120).

2.6. Kuersetin

Kuersetin, JUPAC terminolojisinde 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one olarak adlandırılan kapalı molekül formülü $C_{15}H_{10}O_7$ ile ifade edilen bir flavonoiddir (121).

Kuersetin, 1997 yılında, WHO/FAO tarafından ortaklaşa yürütülen, gıda katkı maddeleri ortak uzman komitesi JECFA tarafından gıdalarda kullanımı açısından değerlendirilmiş ancak yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda toksisite sonuçları nedeniyle kabul edilir günlük alım (ADI) dozu belirlenememiştir. 1998 yılında yapılan çalışmalarda kuersetinin insanlar için potansiyel kanserojen riski değerlendirilmiş ve böyle bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür. 2004 Yılında, yüksek saflıkta gıda sınıfı yani % 98,5 ve üstü kuersetin olarak pazarlanmış ve genel olarak çeşitli gıdalarda kullanım için güvenli olarak kabul edilmiştir (122). Toz formunda, limon sarısı rengindedir ve suda çözünürlülüğü azdır (123).



Resim 4. Kuersetin kimyasal yapısı (124)

Kuersetin, üzüm, elma, domates; soğan, lahana, kapari, çay gibi meyve, sebze ve bitkisel kaynaklı birçok üründe bulunur. Kuersetin, genel sağlığı destekleyen, hastalıklara karşı direnç sağlayan, vücutta hasar oluşturabilecek ajanlara karşı koruyucu etki oluşturma potansiyeline sahip bir antioksidandır (125). Bitkilerin enerji üretiminde etkili olan bu bileşik aynı zamanda bitkileri ultraviyole etkisine karşı da koruduğu savunulmaktadır. Soğan, elma ve çay kuersetin açısından zengin ürünlerdir, ancak en yüksek konsantrasyonu 100 g da 234 mg olarak kaparıde ölçülmüştür (126).

2.6.1 Kuersetinin Vücutta Emilimi

Kuersetinin emilimine dair yapılan araştırmalarda oral yolla alınan kuersetinin oldukça değişken ve zayıf bir biyoyararlanım gösterdiği görülmüştür (127). Düşük biyoyararlanım gösteriyor olsa bile yüksek derecede kritik biyoaktiviteye sahip moleküller içerir (128). Kuersetin mide asidinde stabil halde kalıp, ince bağırsağın üst segmentinde emilim sağladığı gösterilmiştir (129).

Kuersetin molekülüne şekerlerin bağlanması ile kuersetin glikozitleri oluşur ve bu yapıdaki kuersetinlerin yine bağlanan şeker türüne göre ince bağırsaktaki mukozal epitelde yer alan sodyum bağımlı glukoz taşıma reseptörlerine bağlanıp emilimini kolaylaştırdığı düşünülmektedir (130, 131). Kuersetin metabolizması ince bağırsakta başlar ve kalın bağırsak, karaciğer ve böbrek gibi organlarda devam eder (132). Kuersetin molekülleri, ince bağırsak epitelinde, enterik bakteriler ve çeşitli enzimler tarafından emilimi sağlanabilecek formdaki metabolitlere dönüştürülürler (133). Kuersetin molekülündeki omurga yapısının bozulup küçük fenolik parçalara ayrılma işlemi hem ince bağırsakta hem de kolonda meydana gelir. Emilimi sağlanan kuersetin molekülleri ince bağırsak ve karaciğerde biyotransformasyon enzimleri ile metillenip böbreklerde idrar oluşumu ile atılır (134). Kuersetinin atılımı ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda kuersetinin organlarda birikme eğiliminde olduğu, hücreler olarak mitokondriyel alanda konsantrasyon gösterdiği düşünülmüştür (135).

2.6.2. Kuersetinin Biyolojik Etkileri

Kuersetin doğal polar oksin taşıma inhibitörüdür. Kuersetin yapısındaki polifenolün benzo-hidropiran halkasına bağlı dört hidroksil grubu bulunduran ve bu sayede serbest radikalleri ortadan kaldırıcı etkiye sahip en etkili antioksidandır (136). Kuersetin serbest radikallere proton vererek reaksiyona girer ve kendisi eşlenmemiş radikal halini alır. Daha sonra oluşan kuersetin radikali kolay ve hızlı şekilde hücreden uzaklaştırılır (137). Fe^{+2} , Cu^{+2} gibi geçiş metallerini şelatlama özelliğine sahip olup elektron taşınmasını katalizleyerek serbest radikalleri temizleyici etki gösterir (138).

Kuersetin ile yapılan birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda antienflamatuar özelliğe sahip olduğu antikanserojen, bakteriyostatik ve antiviral etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (139). Kuersetinin *in vitro* hücre sistemlerinde, enflamatuar gen ekspresyonlarının önemli ölçüde azalmasında etkili olduğu görülmüştür (140). Farklı flavonoidler ile yapılan bir çalışmada insan aort endotel hücrelerinde tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ile indüklenen adezyon moleküllerinin ekspresyonunu inhibe edici etkileri karşılaştırılmış ve kuersetinin güçlü ve doza bağımlı olarak etkili bir flavonoid olduğu sonucuna varılmıştır (141). Bakteriler üzerindeki etkinliğine dair yapılan araştırmalarda kuersetinin bakterilerin hücre duvarında tahribata yol açıp membran geçirgenliklerini arttırarak enzim aktivitesini bozduğu, protein ve nükleik asit sentezini inhibe ettiği görülmüştür (142). Bu özelliği ile

kuersetin, gentamisinin bakteri tedavisinde destekleyici etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Chia-Ling Ho ve ark. nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kuersetin kullanımının etkilerini araştırmak adına SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattını kullanarak yaptıkları çalışmada kuersetinin, mitokondriyal biyogenezi arttırdığını ve ROS'un sebep olduğu hasarı azalttığını belgelemişlerdir (143).

Kuersetinin diyet flavonoid olarak kullanımının yaygınlaşması, birçok ilaç ham maddesi ve gıda katkı maddesi olarak kullanımında artış ve potansiyel klinik kullanım tartışmaları nedeniyle kuersetinin güvenliği, genotoksisite deneyleri ve akut, subkronik, kronik üreme toksisitesi açısından kapsamlı bir değerlendirmeye alınmıştır (144–146). Kuersetinin testis Ovaryum üzerindeki biyolojik etkilerinin araştırıldığı bazı çalışmalarda kuersetinin oosit kalitesini arttırdığı, granüloza hücrelerinin oksidatif stresini düşürdüğü ve hormon salgılarını arttırdığı görülmüştür (147, 148). Dhanaraj Teekaraman ve ark. yaptığı çalışmada kuersetinin metastatik ovaryum kanseri PA-1 hücre hattında hücre canlılığını doza bağlı şekilde azalttığı Bcl-2 ve Bcl-xL gibi antiapoptotik molekülleri azaltırken proapoptotik moleküllerde artış sağladığı belgelenmiştir (149). Kuersetinin ovaryum kanseri üzerine etkilerinin araştırıldığı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, kanserli hücrelerde P53 aktivasyonu, Bcl-2'nin azalması, Bax, kaspaz-3 ve kaspaz-9 gibi apoptozda görevli moleküllerin artması gibi etkiler gösterip apoptozu indüklediği ve sağlıklı hücrelere zarar vermediği görülmüştür. Buna dayanarak kemoterapötik ajanlarla kombine şekilde kullanılabileceği öngörülmüştür (150, 151). Kuersetin organlarda hasar oluşturabilecek ajanlarla birlikte kullanımında hasarı azaltıcı ya da önleyici etkiler gösterebilir. Yapılan çalışmalarda böbrek, karaciğer ve testis gibi organlarda çeşitli ajanlarla oluşturulan oksidatif stres ve enflamasyona karşı koruyucu olabileceği gösterilmiştir (152, 153).

Napatr Sriraksa ve ark. Sprague Darwey sıçanlarında 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ile oluşturdukları Parkinson modelinde kuersetinin oksidatif stresi azaltma potansiyelini test etmiş ve yüksek dozlarda kuersetinin azaltmasının yanı sıra asetilkolini de arttırarak bilişsel etki sağladığını savunmuşlardır (154).

Yapılan bir çalışmada, Wistar sıçanlarında izoproterenol ile indüklenmiş miyokardiyal iskemi oluşturulmuş ve bir aylık deney süresinde günlük 50, 100 ve 150 mg/kg dozlarında kuersetin uygulanmıştır. Çalışma sonuçları incelendiğinde, tedavi gruplarının doz ile doğru orantılı şekilde anti-enflamatuar etki gösterdiği ve ölçülen SOD, GSH-Px ve CAT

değerlerindeki artış, MDA düzeyindeki azalıştan yola çıkarak, oksidatif stresi azaltıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (155).

Kuersetin gibi flavonoidlerden zengin diyetlerin sağlık açısından olumlu etkilere sahip olduğu düşünülse de alınması gereken dozun iyi ayarlanmadığı takdirde antioksidan özelliğini kaybedip pro-oksidan etki gösterebileceği gerçeği de göz ardı edilemez (156, 157). Yapılan bazı in vitro mutajenite çalışmalarında kuersetinin mutajenik ve genotoksik etki gösterdiği savunulmuştur (158).

Kimberly Vanhees ve ark yaptığı çalışmada doğum öncesi yüksek düzeyde kuersetin diyetinin DNA onarım sistemine hasar verebileceği ve lösemi başlangıcı riskini arttırabileceği bildirilmiştir (159). Dışarıdan alınan diyet flavonoidlerin, topoizomera II gibi enzimleri inhibe etme potansiyeline sahiptir ve bunun sonucunda DNA sarmal kırıkları, mutasyonlar gibi DNA hasarına yol açabilecek genotoksik etkiler gösterebileceği görülmüştür (139).

Dolayısıyla kuersetin her ne kadar antioksidan özelliği ile dikkat çekiyor olsa da bazı durumlarda prooksidan özellik de kazanabileceği görülmektedir. Kuersetinin yüksek dozlarda, ksenobiyotiklerin metabolizmasında yer alan enzimlerin aktivitelerini düzenleyici etkileri de vardır (160). Bu da antibiyotikler ile kuersetinin birlikte kullanımının kontrendikasyon yaratabileceği sonucunu doğurur. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda kuersetinin, ksenoöstrojen etki gösterdiği ve bu durumun folikül gelişiminin östrojene bağımlı evrelerinde sorun yaratabileceği düşünülmektedir (161). Biz de bu çalışmada gentamisin kullanımından kaynaklı doku ve plazmadaki oksidatif stres belirteçlerinin değişimini ve gentamisinin kuersetin ile kombine kullanımının biyobelirteçlerde yaratacağı olumlu ya da olumsuz anlamlı değişimlerin kaydedilmesini amaçladık. Yine çalışmamızın amaçlarından biri de kullandığımız iki farklı saf kuersetin dozunun ovaryum dokusu üzerinde yaptığı histolojik ve biyokimyasal etkilerin karşılaştırılması ile dozaj yüksekliğinde antioksidan etkili flavonoidlerin prooksidan etki gösterip göstermeyeceği konusunda literatüre ufak da olsa bir katkı sağlamaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Temini, Etik Onay ve Barınma Koşulları

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2021/69 numaralı izni ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın finansal desteği KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından (proje numarası: TYL-2022-10087) sağlanmıştır.

Çalışmada kullanılmak üzere 36 adet dişi Sprague Dawley cinsi, 2-3 aylık, 200-250 gr ağırlığındaki sıçanlar, Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi (KTÜCAM) tarafından uygun koşullar altında rastgele çiftleşme sonucu elde edilmiş yavru sıçanların, doğumlarından sonra gerekli süre beklenip sağlıklı bir şekilde yeterli olgunluğa erişmeleri sonucu, aralarından rastgele seçim yapılarak deneye dahil edilmişlerdir.

Tüm sıçanlar KTÜCAM tarafından, deneyin uygulanma ve sonlandırma süreçleri boyunca standart Tip III kafeslerde oda sıcaklığı 22 ± 1 derece, nem oranı %50 olacak şekilde kontrolü sağlanan odalarda barındırıldı. Odalar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda düzenli olarak takip edilerek, kafeslerinin hemen üzerine yerleştirilen kolayca erişebilecekleri standart sıçan yemi ve yine serbestçe ulaşabilecekleri çeşme suyu ile beslenme ve bakımları yapıldı (Resim 5).



Resim 5. Sıçanların barındırıldığı Tip III kafesler

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Uygulanan İşlemler

Sıçanlar, rastgele seçilmiş 6 şar hayvandan oluşan 6 eşit gruba ayrılarak kontrol grubu hariç her grup için literatüre uygun şekilde önceden ayarlanmış dozlarda 7 gün boyunca aynı saatlerde (10-11s) gentamisin (80 mg/2 ml İbrahim Etem Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş, Türkiye) ve kuersetin (Sigma-Aldrich, Co, St, Louis,USA; CAS: 117-39-5 Q4951-100 g, $\geq 95\%$) uygulamaları yapıldı (158, 159, 147). Kontrol grubuna, benzer uygulama stresi oluşturmak adına 7 gün boyunca 1 ml serum fizyolojik i.p. olarak enjekte edildi. Hayvanların son ölçülen ağırlıkları baz alınarak gentamisin dozları kg başına 100 mg olacak şekilde ayarlandı. İlk olarak gentamisin uygulaması yapıp 5 dk beklendikten sonra kuersetin gavajı yapıldı (Resim 6, 7). Kuersetin her uygulamadan önce 3. ve 5. grup için 20 mg/kg, 4. ve 6. grup için de 50 mg/kg olmak üzere 1 ml serum fizyolojik ile iyice çözülerek hazırlandı (Tablo 1).

Tablo 1. Deney grupları ve uygulanan işlemler

Grup İsimleri	Yapılan Uygulama
Kontrol (K)	Deneyin 1. Gününden başlayarak 7 gün boyunca 1 ml serum fizyolojik i.p. olarak uygulandı.
Gentamisin (GEN)	Deneyin 1. Gününden başlayarak 7 gün boyunca GEN (100mg/kg) i.p. olarak uygulandı.
Gentamisin+Kuersetin1 (GEN+QCT1)	Deneyin 1. Gününden başlayarak 7 gün boyunca GEN (100mg/kg) i.p. olarak ve QCT1 (20mg/kg) gavaj yolu ile uygulandı.
Gentamisin+Kuersetin2 (GEN+QCT2)	Deneyin 1. Gününden başlayarak 7 gün boyunca GEN (100mg/kg) i.p. olarak ve QCT2 (50mg/kg) gavaj yolu ile uygulandı.
Kuersetin1 (QCT1)	Deneyin 1. Gününden başlayarak 7 gün boyunca QCT1 (20mg/kg) gavaj yolu ile uygulandı.
Kuersetin2 (QCT2)	Deneyin 1. Gününden başlayarak 7 gün boyunca QCT1 (50mg/kg) gavaj yolu ile uygulandı.



Resim 6. Sıçanlara gentamisin'in i.p. yolla verilmesi



Resim 7. Sıçanlara kuersetin'in oral gavaj yoluyla verilmesi

3.3. Doku Numunelerinin Elde Edilmesi

Deneyin başlangıcı 1. gün kabul edilmiş ve 8. gün tüm sıçanlar anestezi altındayken (i.p. ketamin 90 mg/kg) kansızlaştırma yöntemi ile sakrifiye edilmiştir. Alınan kan örnekleri biyokimyasal parametreler için Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)'lı tüpe konulup; vakit geçirmeden hızlıca hayvanlar alt abdominal bölgeden orta hat kesilerek sağ ve sol ovaryumları çıkarılıp ayrı ayrı tartıldı (Resim 8). Daha sonra sağ ovaryum bütün olarak %10'luk formalin solüsyonunda tespit işlemine alındı. Sol ovaryum ise biyokimyasal değerlendirmeler için Eppendorf tüplerine alınıp analiz edilmek üzere ayrıldı.



Resim 8. Ovaryum dokularının çıkarılması

3.4. Histolojik İşlemler

3.4.1. Histolojik Analizler için Doku Örneklerinin Hazırlanması

Deneyin 8. günü anestezinin etkisindeki sıçanlar kansızlaştırma yöntemi ile sakrifiye edildikten sonra hayvanın alt abdominal bölgesinden orta hat boyunca kesilerek ovaryumları çıkarıldı. Sağ Ovaryum histolojik analizler için kullanılmak üzere çıkarıldıktan sonra etrafındaki dokulardan kabaca temizlenerek ovaryum dokusu üzerinde herhangi bir trimleme yapılmadan hassas terazide tartıldıktan sonra bütün olarak doku takip kasetlerine yerleştirildi. %10 luk formalin solüsyonuna atılarak tespit işlemine başlandı. Sol ovaryumlar da çıkarıldıktan sonra etrafındaki dokular temizlenip önceden hazırlanmış ependorf tüplerine konulup biyokimyasal analizleri yapılmak üzere -80 C de saklamaya alındı.

3.4.2. Dokuların Fikse Edilmesi

Fiksasyon aşaması doku mimarisinin korunması açısından en önemli basamaktır. Fiksatifin görevi dokudaki proteinlerin denatürasyonuna ve pıhtılaşmasına sebep olan proteinlerin çapraz bağlanmasını sağlayarak doku mimarisinin bozulmasını önlemektir. Formalin, formaldehit gazının suda çözünmesi sonucu elde edilen en yaygın kullanıma sahip fiksatiflerden biridir. Çıkarılan ovaryum dokularının metabolik aktivitesini sona erdirip enzimatik yıkımdan korumak amacıyla %10'luk formalin fiksatifi kullanıldı.

3.4.3. Dokuların Takibi

Histolojik analizleri yapılmak üzere çıkarıp kasetlenen dokular %10 luk formalin solüsyonunda 3 gün tespit edilmiştir. Sonrasında KTÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı labratuvarında yer alan doku takip cihazı (Thermo Scientific Excelsior AS, Thermo Shandon Limited, Runcorn, UK) ile cihazı ile rutin doku takip işlemi yapılmıştır. Mikrotom ile kesim yapılırken dokuların dağılmadan düzgün bir şekilde kesitlerinin alınabilmesi için dokuların sert ve sabit olması gereklidir. Dokuları sertleştirmek için dondurma, parafine gömme ya da jelatine gömme gibi farklı yöntemler kullanılır. Bu deneyde tespit işlemi tamamlanan ovaryum dokuları doku bloklama cihazı (Leica HistoCore Arcadia Embedding System, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Almanya) Cihazı kullanılarak dokuların uygun konumlarda parafine gömülme işlemi gerçekleştirildi ve parafin bloklar elde edildi (Tablo 2).

Tablo 2. Doku Takip Aşamaları

Dokuların Takip Aşamaları	
%70'lik etanol	24 saat
%90'lık etanol	24 saat
%100'lük etanol	24 saat
%100'lük etanol	1 saat
Ksilen	5 dk (3 kez)
Dokular eritilmiş parafin içerisinde 58°C'de etüvde 3 kez 15 dakika olmak üzere ve sonrasında tekrar etüv içerisinde 2 saat bekletildi.	
Dokular oda sıcaklığında bloklandı.	

Bu parafin bloklar bir gün boyunca -20°C de soğumaya bırakıldı. Kesim için uygun hale gelen bloklar tam otomatik mikrotom (Leica RM2255, Germany) cihazı kullanılarak, doku kesitinin ilk görüldüğü kesitten itibaren alınacak iki kesit arasında 50 µm mesafe olacak şekilde sayılarak kesitler alınmıştır.

Ovaryum dokularında folikül sayımı yapılacağı için tüm dokudan, en küçük folikülün ortalama çapını aşmayacak şekilde belirlenmiş aralıklarla kesitler sıralı bir şekilde alınmıştır. Tüm bloklar, doku başlangıcından bitimine kadar her kesit arası 9 kesit sayılıp 10. kesit alınarak toplamda 50 µm aralıklarla kesilip sıralı bir şekilde lamlara alınmıştır. Lamlara alınmadan önce mikrotom bıçağı ile kesimden kaynaklı oluşabilecek katlantıları çözmek amacıyla benmari içerisinde 37 °C de suda doku bir süre bekletilmiş daha sonra lam 45 derecelik açı ile suya daldırılıp doku ile lam arasında hava kabarcığı kalmayacak şekilde lam üzerine alınmıştır. Lam üzerinde bir gün boyunca bekletilen dokular hematoksilin ve eozin, Masson trikrom ve periodik asid-Schiff ile boyanmaya hazır hale gelmiştir.

3.4.4. Hematoksilin & Eozin Boyama Yöntemi

Hematoksilen Eozin boyama yöntemi, hücresel yapıların asidofilik, bazofilik özelliklerinden yararlanan ve genellikle hücre çekirdeği ile sitoplazması arasındaki farklılıkları görselleştirmek amacı ile kullanılan bir boyama çeşididir. Hematoksilin hücre çekirdeğini mavi-mor renge boyayan bazik bir boyadır. Eozin ise hücre sitoplazmasını pembe renge boyayan asidik bir boyadır. Bu çalışmada da boyanmak üzere hazırlanan ovaryum doku kesitlerinin çekirdek sitoplazma ayrımını yapabilmek ve genel doku histolojik yapısını incelemek için hematoksilin eozin boyama yöntemi kullanıldı.

Hematoksilen Eozin boyama için lam üzerinde bekletilen dokular zembile alınarak tam otomatik doku boyama cihazına (Leica Biosystems RM2245 Semi-Automated Rotary Microtome, Leica Microsystems Ltd. Nussloch, Almanya) yerleştirildi. Boyama işlemi için en iyi sonuç veren süreler için önceden ayarlanan programda boyama işlemi başlatıldı. İlk adım 45 dk boyunca cihazda yer alan 58 derecelik fırında lam üzerindeki dokuların parafininin eritilmesi işlemiydi. Dokuların etrafındaki parafin eridikten sonraki boyama cihazında sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi (Tablo 3).

Tablo 3. Hematoksilen eozin boyama aşamaları

Hematoksilen Eozin Boyama Aşamaları	
Ksilen	5 dk
Ksilen	5 dk
%100'lük etanol	5 dk
%96'lık etanol	5 dk
%70'lik etanol	5 dk
Distile su	1 dk
Hematoksilen	1.5 dk
Musluk suyu	1 dk
Asit alkol	1 defa batır-çıkart
Distile su	1 dk
Amonyaklı su	10 saniye
Distile su	1 dk
Eozin	1 dk
Distile su	1 dk
%96'lık etanol	5 dk
%100'lük etanol	5 dk
Ksilen	5 dk
Ksilen	5 dk
Entellan ile kapatıldı	

3.4.5. Histolojik ölçümler

H&E ile boyanıp mikroskopta incelemeye hazır hale getirilen preparatlar, Olympus DP 71 (Japan) kameralı ışık mikroskobu ile (Olympus, BX51, Japan) ile Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak incelendi.

Her hayvan için hazırlanan seri kesit preparatlarından rastgele örnekleme ile seçilen 5 preparatta, foliküllerin granüloza hücre şekilleri ve katman sayıları dikkate alınarak; primordiyal folikül, tek tabakalı primer folikül, çok tabakalı primer folikül, sekonder folikül, Graaf folikülü ve atretik foliküllerin morfolojik sınıflandırması yapıldıktan sonra, tek tek sayımı yapıldı (Tablo 4).

Atretik follikül tanımı: $\frac{1}{4}$ granüloza hücreleri sitoplazma içinde otofajik vakuoller ve kabarcıklar içerir. Granüloza hücreleri süreksiz bir zona pellucida ile diğer komşu hücrelerden (teka tabakası) ayrılmıştır (164). Küçük folliküllerde granüloza hücreleri ve immatür oositler küçülür ve dejenere olur (165). Büyük folliküllerde granüloza hücrelerinde apoptozis, antruma dökülme, nötrofil ve makrofaj invazyonu olur. Follikülün kavitesine bağ dokusu invazyonu olur. Zona pellusida büzülür ve camsı membran görünümü olur (166).

Ovaryum dokusundaki hasar; ovaryum foliküler hücre dejenerasyonu, vasküler konjesyon, germinal epitelde dejenerasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından değerlendirildi. Değerlendirme yarıkantitatif olarak, her bir kriter için 0 ila 3 (0: yok; 1: hafif; 2: orta; 3: şiddetli) arasında değişen ölçek kullanılarak skorlandı (167)(168).

Tablo 4. Foliküllerin sınıfları ve morfolojik özellikleri

Folikül Sınıfı	Morfolojisi
Primordiyal Folikül	Tek katlı yassı folikül hücreleri ile çevrili oosit
Unilaminar Primer Folikül	Tek katlı kübik folikül hücreleri ile çevrili oosit
Multilaminar Primer Folikül	Çok katlı granüloza hücreleri ile çevrili oosit
Sekonder Folikül	Teka tabakaları belirginleşmiş, çok katlı granüloza hücreleri arası antral boşluklar oluşmaya başlamış
Graaf Folikül	Teka tabakaları gelişmiş, belirgin tek bir antral boşluk ve kumulus ooforus yapısı oluşmuş
Atretik Folikül	Dejenere olmuş, camsı yapı kazanmış folikül

3.4.6. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Masson trikrom boyama yöntemi ile doku kesitlerinde kollajen, kas dokusu gibi yapılar ayırt edilir. Bu boyama yöntemi, özellikle fibrozis durumunda kollajen birikiminin tespit edilmesi için sıklıkla kullanılır. Gruplara ait preparatların boyanmasında (GBL® CONVASTAİN-Masson trikrom boyama seti, ürün kodu: 5022) kullanıldı. Üretici firmanın boyama protokolüne uygun olarak boyama yapıldı (Tablo 5).

Tablo 5. Masson trikrom boyama yöntemi

Masson Trikrom Boyama Aşamaları	
Weigert Demirli Hematoksilin Çözeltisi A	Herbirinden 5 er damla karıştır. Preparata
Weigert Demirli Hematoksilin Çözeltisi B	ekle 30-40 dk beklet, distile su ile yıka
Pikrik Asit Alkolik Çözeltisi C	10 damla – 4 dk beklet, distile su ile yıka
Gelincik Kızılı Fuksin Çözeltisi D	10 damla – 4 dk beklet, distile su ile yıka
Fosfomolibdik Asit Çözeltisi E	10 damla – 10 dk beklet, distile su ile yıka
Masson Anilin Mavisi Çözeltisi F	10 damla – 5 dk beklet, distile su ile yıka
Asit serilerinden geçirerek dehidrasyon	

Bu adımdan sonra, doku örnekleri dehidratasyon ve şeffaflaştırma işleminden geçirilir ve mikroskopta incelemek üzere hazır hale getirilir.

Ovaryum dokusundaki fibrozis yarıkantitatif olarak değerlendirildi. Bu değerlendirmede 0 ila 3 (0: yok; 1: hafif; 2: orta; 3: şiddetli) arasında değişen ölçekler kullanılarak skorlama yapıldı.

3.4.7. Periodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi

PAS boyama tekniği ile glikojen, glikoprotein gibi polisakkaritler, bazı zar proteoglikanları boyanır. Polisakkarit yapısındaki karbonhidrat bileşenlerinin hidroksil grubuna bağlı aldehit ve keton yapıları boyanın bağlanmasını sağlayan bölgeleri oluşturur.

Boyama için hazırlanan doku kesitlerine ilk olarak periodik asit çözeltisi damlatılır. Bu işlem sonucu polisakkaritlerin aldehit ve keton grupları okside olup çift bağları kırılır. Çift bağların kırılması sonucu zincirde boşluklar oluşur ve sonraki adımda uygulanacak Schiff reaktifi bu açılan alanlarda reaksiyon oluşturur. Doku örneğine damlatılan Schiff reaktifi aldehit ve keton grupları ile reaksiyon oluştururarak kırılan bağların arasında kalan karbonhidratlarla pembe veya kırmızı renkli bir kompleks oluşturur. Ovaryumda PAS boyama ile yumurta hücrelerini çevreleyen zona pellusida yapısını, antral boşluklarda ve granüloza hücrelerindeki glikojen seviyelerini, theca hücrelerinde polisakkaritlerin varlığının histolojik değerlendirmesinin yapmak mümkündür. Bu çalışmada (ATOM SCİENTİFİC PAS stain kit (modified McManus 1946), RRSK15-100) kullanıldı ve PAS boyama prosedürüne uygun olarak dokuların boyaması yapıldı (Tablo 6). PAS boyama ile zona pellusida ve bazal membranın histopatolojik değerlendirmesi yapıldı.

Tablo 6. Periodik asit Schiff boyama aşamaları

Periodik Asit Schiff Boyama Aşamaları	
Periodik asit çözeltisi ile oksitleme	5 dk
Distile su	2 dk
Schiff reaktifi	20 dk
Distile su	5-10 dk
Hematoksilen boyama	1 dk
Distile su	
Alkolle dehidrasyon	

3.5. Biyokimyasal İncelemeler

Biyokimyasal analizler için sol ovaryum dokularında oksidatif stres belirleyicileri olarak doku ve plazma malondialdehit (MDA), doku süperoksit dismutaz (SOD), doku katalaz (CAT) ve doku glutatyon peroksidaz (GPx) seviyeleri ölçüldü. Süperoksit dismutaz (SOD), antioksidan savunma sisteminde rol oynayan ROS ve süperoksit anyon radikallerine karşı en önemli antioksidan savunma sistemidir.

Glutasyon peroksidaz hücre sitoplazmasında yer alan H_2O_2 'yi suya parçalayan önemli bir antioksidandır. Katalaz hücrede oluşan H_2O_2 'yi ortadan kaldırır. MDA, SOD, CAT ve Gpx değerleri bize bozulmuş antioksidan seviyeleri hakkında fikir verir.

Deney sonunda kurban edilen sıçanlardan alınan over dokuları serum fizyolojikle yıkandı, fazla kan uzaklaştırıldı ve analiz gününe kadar GPX, SOD, CAT ve MDA ve protein tayinlerini gerçekleştirmek için $-80^{\circ}C$ 'de saklandı. Kan örnekleri EDTA içeren antikoagülanlı tüplere alındı. Daha sonra $3000\times g$ 'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen plazma örnekleri ayrı bir tüpe aktarıldı ve analiz gününe kadar MDA seviyelerini ölçmek için $-80^{\circ}C$ 'de saklandı. Analiz gününde doku örneklerinin bir kısmında SOD, CAT, MDA ve protein ölçümleri gerçekleştirildi. Belirlenen parametreleri ölçmek için, yaklaşık 30 mg doku üzerine pH 7.4 olan PBS'den 500 μL ilave edildi ve el homojenizatörü yardımı ile 20 saniye boyunca homojenize edildi. Homojenat $5000\times g$ 'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlarda istenilen ölçümler gerçekleştirildi. Geri kalan over dokusunda da GPx aktivite ölçümü yapıldı.

3.5.1. Plazma MDA Ölçümü

Plazma örneklerinde MDA miktarını ölçmek için, Yagi tarafından geliştirilen TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) metodu kullanıldı (169). Yöntemin esası lipid peroksidasyon ürünü (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasında meydana gelen reaksiyonda oluşan rengin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır.

Çözeltilerin Hazırlanması

1) 22.8 M Sülfirik asit (H_2SO_4) Çözeltisinin Hazırlanması: %98'lik H_2SO_4 'ten 228 μL alınıp 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.

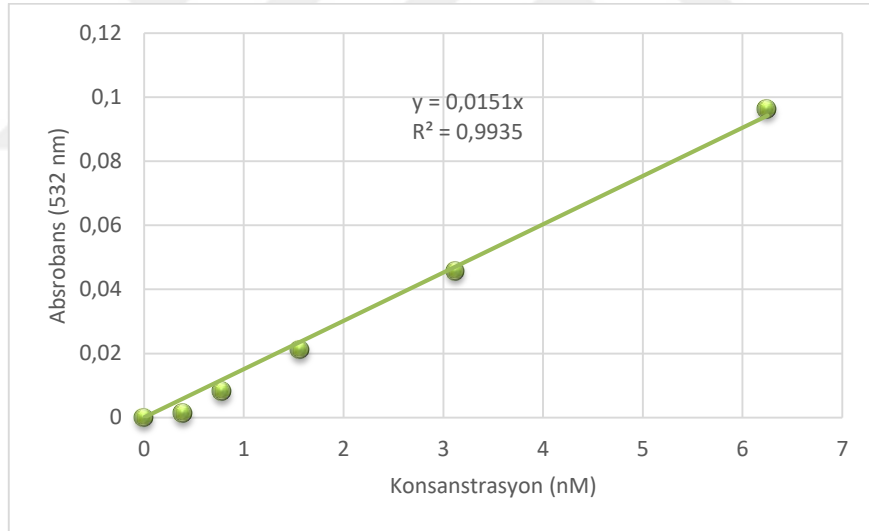
2) Tiyobarbitürik Asit (TBA) Çözeltisinin Hazırlanması: 0.67 g TBA tartılıp 50 mL kadar saf su ile ısıtılarak çözüldü. Soğuyan çözeltinin üzerine 50 mL asetik asit ilave edildi.

3) Fosfotungustik Asit Çözeltisinin Hazırlanması: 1 g fosfotungustik asit tartılıp 9 mL kadar saf su ile çözüldü.

4) Standart çözeltiler: 10.000 nM'lık tetrametoksipropan stok standart çözeltisinden ara stok çözelti hazırlandı. Daha sonra seri dilüsyonlar yapılarak 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 nM'lık standart çözeltiler hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

- 1) Bir deney tüpüne 150 µL plazma 1.2 mL H₂SO₄ ve 150 µL fosfotungustik asit eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika bekletildi. Bu aşamada proteinlerin çökmesi sağlandı.
- 2) Elde edilen karışım 1500xg'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 3) Geriye kalan çökelek üzerine 2 mL saf su eklendi ve bir vorteks yardımıyla iyice çözünmesi sağlandı.
- 4) Her bir standart ve örnek tüpünün üzerine 500 µL TBA eklendi ve 1 saat 100 °C' de inkübe edildi.
- 5) İnkübasyonun ardından tüpler 1000xg'de 10 dk santrifüj edildi.
- 6) Üstteki berrak kısımdan 300 µL bir okuma pleytine aktarıldı ve 532 nm dalga boyunda absorbanslar okundu.
- 7) Elde edilen standart grafikten yararlanılarak plazma MDA miktarı nM olarak belirlendi (Şekil 7).



Şekil 7. Serum örneklerinde MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği

3.5.2. Doku MDA Ölçümü

Doku örneklerine MDA ölçümü için Mihara ve Uchiyama tarafından belirlenen yöntem kullanıldı (170). Bu metodun esası, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asitle oluşturduğu pembemsi rengin 532 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler:

1) %1'lik H_3PO_4 çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL %85'lik H_3PO_4 alındı ve son hacim distile su ile balon jode 250 mL'ye tamamlandı.

2) Tiyoarbiturik asit (TBA) çözeltisi: 0.67 g TBA tartıldı ve 50 mL distile suda ısıtılarak magnetik bar yardımıyla çözüldü. Ardından soğuduktan sonra üzerine 50 mL asetik asit ilave edildi.

3) Standart çözeltiler: 10.000 nM'lık tetrametoksipropan stok standart çözeltisinden ara stok çözelti hazırlandı. Daha sonra seri dilüsyonlar yapılarak 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 nM'lık standart çözeltiler hazırlandı.

Deneyin yapılışı:

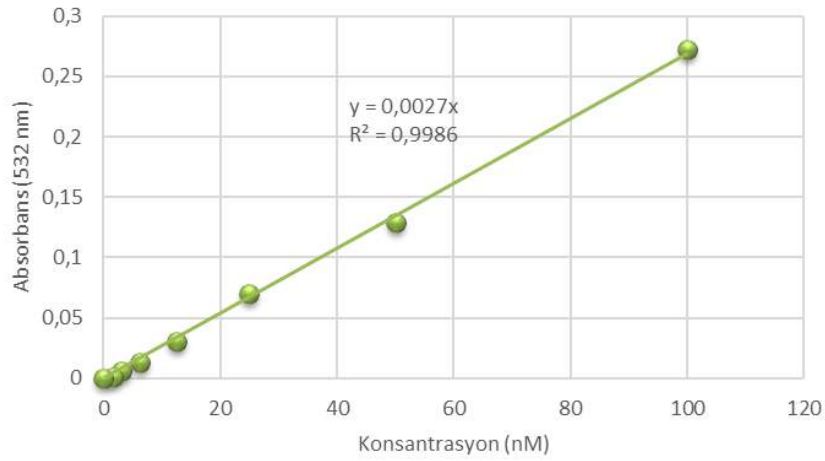
Doku MDA ölçümü için tablo 7'ye göre pipetlemeler yapıldı ve 532 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

Tablo 7. Doku MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Hacim (μ L)
Süpernatant, Standart, Kör	100
%1' lik H_3PO_4 Çözeltisi	600
TBA Çözeltisi	200

100 °C' de 45 dk inkübasyon

Şekil 8'daki standart grafik kullanılarak MDA konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar ise nmol/g protein olarak hesaplandı.



Şekil 8. Over dokularında MDA aktivitesini hesaplamak için kullanılan standart grafiği

3.5.3. CAT Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz aktivitesinin tayininde Aebi metodu modifiye edilerek kullanıldı (171). Bu metodun esası, H_2O_2 'nin CAT tarafından parçalanması ve absorbans düşüşünün 240 nm dalga boyunda takip edilmese dayanmaktadır.

Katalaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

1) 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.00): 3.405 g KH_2PO_4 ve 4.45 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 500'er mL saf suda çözüldüler. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1.5 oranında karıştırıldı ve pH'sı 7.0'a ayarlandı.

2) % 0,216 lık hidrojen peroksit (H_2O_2): 0.36 mL % 30'luk H_2O_2 alındı ve hazırlanan fosfat tamponu ile hacmi 50 mL'ye tamamlandı. Çözeltinin taze hazırlanmasına dikkat edildi ve ışıktan korundu.

Aktivite ölçümü için doku homojenatları 30 kat seyreltildi ve Tablo 8'de belirtildiği gibi pipetleme yapıldı.

Tablo 8. Katalaz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat Tamponu	375	-
Numune	750	375
H_2O_2	-	750

240 nm dalga boyunda okuma yapmak için kuartz küvetler kullanıldı. Küvetlere hidrojen peroksit ilave edilir edilmez 240 nm'deki absorbanslardaki düşüş takip edildi. Absorbanstaki düşüş 30 sn de 0.03 den az 0.2 den fazla olmamasına dikkat edildi ve buna göre seyretleme oranları belirlendi. Katalaz aktivitesinde birim olarak birinci derece reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. Aktivite hesabı "Eşitlik 1" kullanılarak yapıldı. Sonuçlar k/g protein olarak ifade edildi.

A1= Başlangıç absorbans

A2= 10 sn sonraki absorbans

(Eşitlik1)

$k = (2.3/10) \times \log (A1/A2) \text{ sn}^{-1}$

3.5.4. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü

Doku örneklerinde SOD enzim aktivitesi ölçümü Sun ve Oberley'in geliştirdiği yöntem kullanıldı (172). Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan $O_2^{\cdot -}$ radikallerinin nitroblue tetrazoliumu indirgemesi sonucu oluşan mor renkli formazan molekülünün 560 nm'de verdiği absorbansın ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Oluşan mor renkli bileşiğin rengi ile enzim aktivitesi ters orantılıdır. SOD enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Kullanılan Reaktiflerin Hazırlanması:

2 M $(NH_4)_2SO_4$ Çözeltisi: 2.64 g $(NH_4)_2SO_4$ 10 mL saf suda çözülür. Ksantin oksidaz enziminin hazırlanmasında kullanılır.

167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi: 3.83 U/ mL'lik orijinal şişeden 87 μ L alınıp 2 mL' ye $(NH_4)_2SO_4$ çözeltisi ile tamamlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi günlük hazırlanır.

0.8 mM $CuCl_2$ Çözeltisi: 6.82 mg $CuCl_2$ alındı ve 50 mL deiyonize suda çözülür. Spektrofotometrik ölçümden hemen önce oluşan reaksiyonu durdurmak için kullanılır.

150 μ M Nitroblue Tetrazolium Çözeltisi: 4.9 mg nitroblue tetrazolium 40 mL deiyonize suda çözülerek elde edildi. Nitroblue tetrazolium çözeltisi ışıktan korundu.

SOD Reaktif Karışımı: 3.65 mg ksantin, 8.93 mg etilendiamintetraasetik asit, 1.01 g Na_2CO_3 , 12 mg BSA tartıldı ve hacmi 156 mL'ye tamamlandı.

Standart çözeltiler: 100 U/mL'lik stok SOD standardından 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0 U/mL' lik SOD standartları deiyonize su kullanılarak hazırlanır.

Over dokusunda 2 kat seyreltme yapıldı. SOD aktivitesi ölçümü Tablo 9’a göre gerçekleştirildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon tüplerine 400 µL CuCl₂ çözeltisi ilave edilip reaksiyon durduruldu ve 560 nm okuma yapıldı.

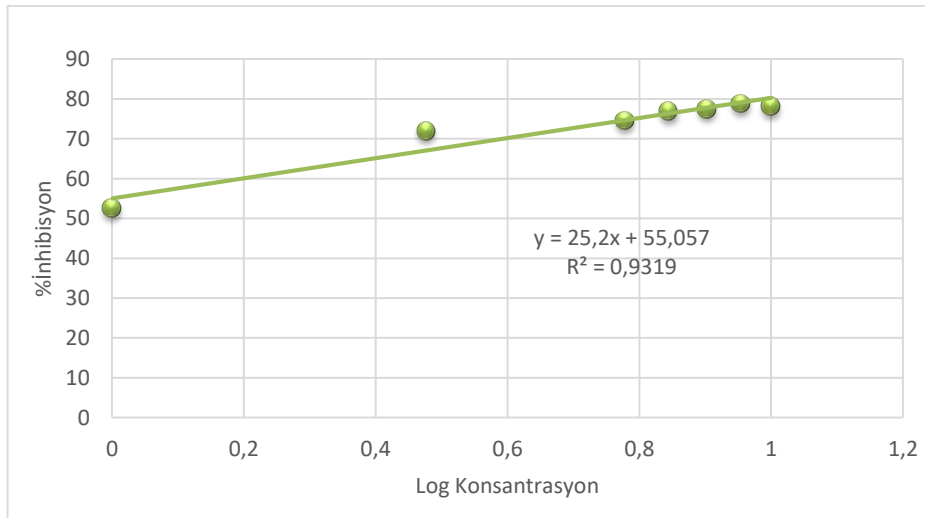
Tablo 9. SOD aktivitesi ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Hacim (µL)
Numune, Standart, Kör	200
SOD Reaktif Karışımı	796
Nitroblue Tetrazolium	204
Ksantin Oksidaz	20
25 °C’ de 20 dk inkübasyon	

SOD aktivitesi hesabında kullanılan % inhibisyonu belirlemek için “Eşitlik 2” denklemi kullanıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = ((\text{Abs Kör} - \text{Abs Numune}) \div (\text{Abs Kör})) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Standart grafiği, % inhibisyona karşılık gelen konsantrasyonların logaritması belirlenerek Şekil 9 da gösterildiği gibi çizildi.



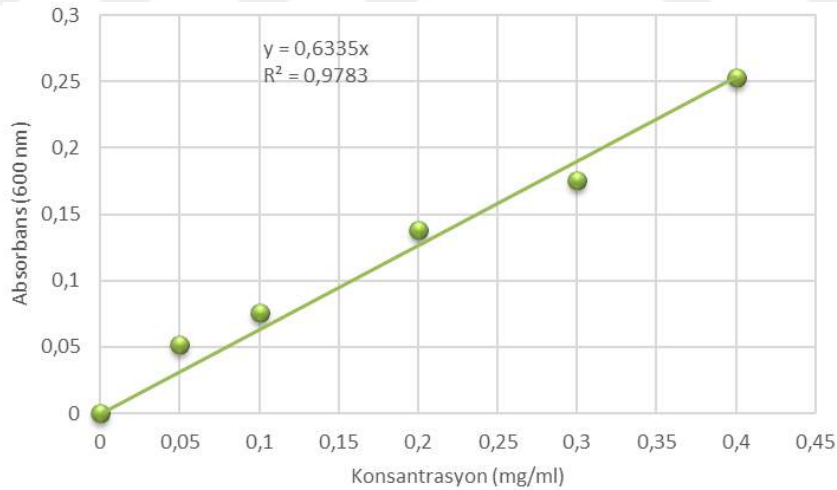
Şekil 9. Over dokularında SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan standart grafiği

3.5.5. GPX Aktivite Ölçümü

Over dokularından GPX aktivitesi, 703102 katalog numaralı ticari kolorimetrik assay kit kullanılarak (CAYMAN, Michigan, USA) üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda Valentine ve ark. (172) geliştirdiği yöntemle göre belirlendi. Yaklaşık 15 mg doku üzerine 50 mM Tris HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA ve 1mM DTT içeren homejenizasyon tamponundan 150 µL ilave edildi ve el homojenatörü yardımı ile 20 saniye boyunca homojenize edildi. Homojenat 10.000x g'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlarda GPX aktivite ölçümü ve protein tayinleri gerçekleştirildi. Sonuçlar nmol/dk/mg protein olarak ifade edildi.

3.5.6. Protein Tayini

Elde edilen doku homejenatlarında protein tayini Bradford metodu (173) ile yapıldı. Bu metodun prensibi; organik bir boya olan Coomassie Brilliant Blue G250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması ve oluşan mavi renkli kompleksin 600 nm'de maksimum absorbanans göstermesi esasına dayanmaktadır. Şekil 10'deki standart grafik kullanılarak protein konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar ise mg/mL olarak hesaplandı.



Şekil 10. Over dokularında protein seviyelerini hesaplamak için kullanılan standart grafiği

3.6. İstatistiksel Analiz

Deney gruplarının normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uymayan ikiden fazla parametrenin değerlendirilmesi için Mann Whitney U testleri uygulandı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

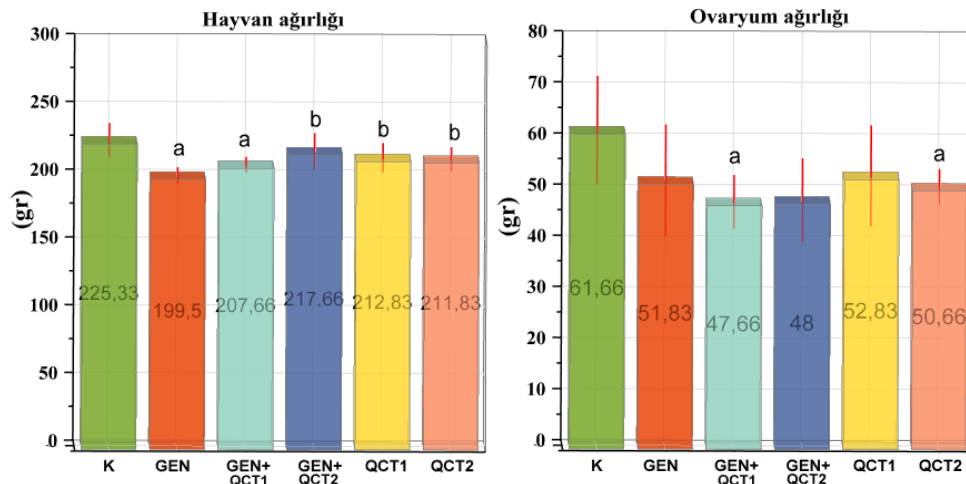
4.1. Vücut Ağırlıkları ve Ovaryum Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Çalışma sonunda tüm gruplara ait sıçanların ağırlıkları ölçüldü. Ağırlıkların ölçümünde GEN ve GEN+QCT1 grubunda vücut ağırlıkları kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı. GEN+QCT2, QCT1 ve QCT2 gruplarında ise GEN grubuna göre anlamlı olarak arttı. Aynı şekilde çalışma sonunda sıçanların sağ overlerinin ağırlıkları tartıldı ve sonuçlar karşılaştırıldı. Buna göre GEN+QCT1 grubunda ve QCT2 grubunda over ağırlığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı (Tablo 10, Şekil 11).

Tablo 10. Hayvan ağırlıkları ve over ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırılması

Gruplar	Hayvan Ağırlıkları (gr)	Ovaryum Ağırlıkları (gr)
K	225.33±12.72	61.66±10.57
GEN	199.50±6.12 ^a	51.83±10.94
GEN+QCT1	207.33±5.78 ^a	47.66±5.27 ^a
GEN+QCT2	217.66±13.36 ^b	48.00±8.22
QCT1	212.83±10.87 ^b	52.83±9.86
QCT2	211.83±9.06 ^b	50.66±3.55 ^a

Değerler ortalama±standart sapma (mean±SD) şeklinde verildi.
^a:K, ^b: GEN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).



Şekil 11. Hayvan ağırlıkları ve over ağırlıklarının istatistiksel grafiği. Değerler ortalama±standart sapma (mean±SD) şeklinde verildi. a:K, b: GEN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

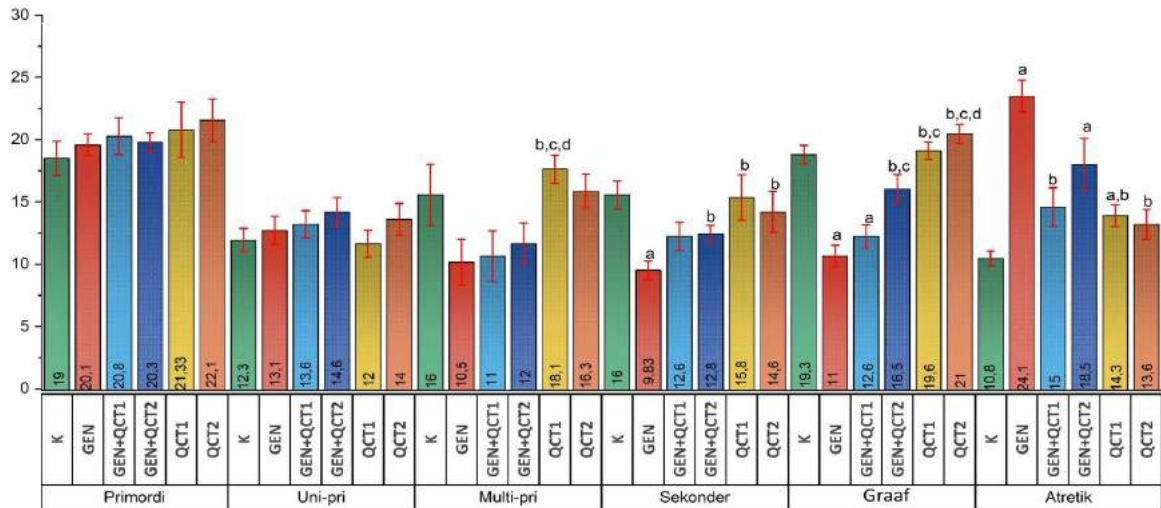
4.2. Ovaryum Folikül Sayılarının Değerlendirilmesi

Deney sonrası hematoksilen eozin ile boyanıp hazır hale getirilen ovaryum seri kesitlerine ait preparatlardan, kesit sırasını gözeterek 5'er preparat alınıp foliküller tek tek sayıldı. Ovaryum seri kesitlerinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen folikül sayımları; primordiyal folikül, unilaminar primer folikül, multilaminar primer folikül, sekonder folikül, Graaf folikül ve atretik folikül olarak, gruplar arasında değerlendirildi. Buna göre, primordiyal foliküllerin ve unilaminar primer foliküllerin istatistiksel değerlendirmesinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı. Multilaminar primer folikül sayılarının istatistiksel değerlendirmesinde QCT1 grubunda GEN, GEN+QCT1 ve GEN+QCT2 grubuna göre anlamlı olarak arttı. Sekonder folikül sayılarının istatistiksel değerlendirmesinde GEN+QCT2, QCT1 ve QCT2 grubunda GEN grubuna göre anlamlı olarak arttı. Graaf folikül sayılarının istatistiksel değerlendirmesinde GEN ve GEN+QCT1 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı; GEN+QCT2 ve QCT1 grubunda GEN ve GEN+QCT1 grubuna göre anlamlı olarak arttığı belirlendi. QCT2 grubunda ise Graaf folikül sayısı GEN, GEN+QCT1 ve GEN+QCT2 grubuna göre anlamlı olarak arttı. Atretik folikül sayılarının istatistiksel değerlendirmesinde, GEN ve GEN+QCT2 ve QCT1 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. GEN+QCT2, QCT1 ve QCT2 grubunda GEN grubuna göre atretik folikül sayısı anlamlı olarak azaldı (Tablo 11, Şekil 12).

Tablo 11. Ovaryum folikül sayılarının istatistik verileri

Foliküller	K	GEN	GEN+ QCT1	GEN+ QCT2	QCT1	QCT2
Primordiyal	19	20.1	20.8	20.3	21.33	22.1
Folikül	±1.39	±0.90	±1.51	±0.80	±2.26	±1.73
Unilaminar	12.3	13.1	13.6	14.6	12	14
Primer Folikül	±0.95	±1.16	±1.11	±1.20	±1.12	±1.31
Multilaminar	16	10.5	11	12.0	18.1	16.3
Primer Folikül	±2.51	±1.89	±2.08	±1.71	±1.16 ^{b,c,d}	±1.40 ^b
Sekonder	16	9.83	12.6	12.8	15.8	14.6
Folikül	±1.15	±0.74 ^a	±1.17	±0.70	±1.85	±1.68 ^b
Graaf	19.3	11	12.6	16.5	19.6	21
Folikül	±0.76	±0.89 ^a	±0.95 ^a	±1.17 ^{b,c}	±0.71 ^{b,c}	±0.77 ^{b,c,d}
Atretik	10.8	24.1	15	18.5	14.3	13.6
Folikül	±0.60	±1.30 ^a	±1.59 ^b	±2.14 ^a	±0.91 ^{a,b}	±1.20 ^b

Değerler ortalama±standart hata (mean±SE) şeklinde verildi.
a:K, b: GEN, c:GEN+QCT1, d:GEN+QCT2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).



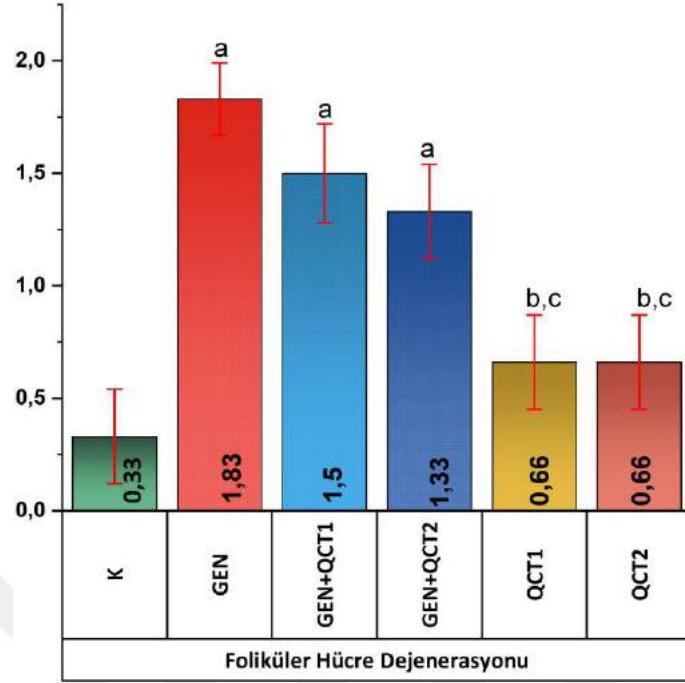
4.3. Morfolojik Bulgular

4.3.1. Histopatolojik Değerlendirme

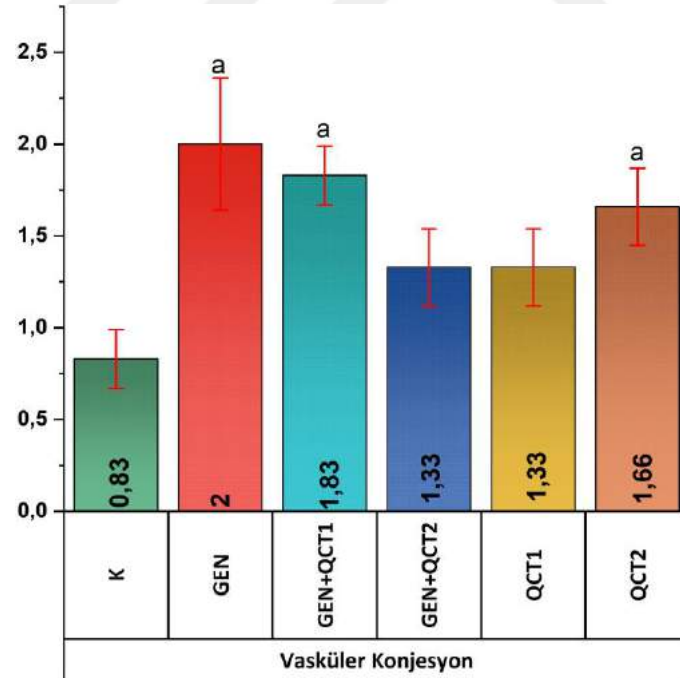
Ovaryum doku kesitlerinde; foliküler hücre dejenerasyonu, vasküler konjesyon, germinal epitel dejenerasyonu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gibi histopatolojik bulgular değerlendirildi. FHD oranı, kontrol grubuna göre GEN, GEN+QCT1 ve GEN+QCT2 gruplarında anlamlı derecede arttı. QCT1 ve QCT2 gruplarında bu oran GEN ve GEN+QCT1 gruplarına göre anlamlı derecede azaldı. VK oranı, kontrol grubuna göre GEN, GEN+QCT1 ve QCT2 gruplarında anlamlı derecede arttı. GED oranı, kontrol grubuna göre GEN, GEN+QCT1 ve GEN+QCT2 gruplarında anlamlı derecede arttı. QCT1 ve QCT2 gruplarında bu oran GEN grubuna göre anlamlı olarak azaldı. İH infiltrasyonu, kontrol grubuna göre GEN, GEN+QCT1, GEN+QCT2 ve QCT2 gruplarında anlamlı derecede arttı. QCT1 grubunda bu oran GEN ve GEN+QCT1 gruplarına göre anlamlı derecede azaldı. Fibrozis oranı, kontrol grubuna göre GEN, GEN+QCT1 ve GEN+QCT2 gruplarında anlamlı derecede arttı. GEN+QCT1, GEN+QCT2, QCT1 ve QCT2 gruplarında bu oran GEN grubuna göre anlamlı derecede azaldı (Tablo 12, Şekil 13-17).

Tablo 12. Ovaryum doku skorlamasının istatistik verileri

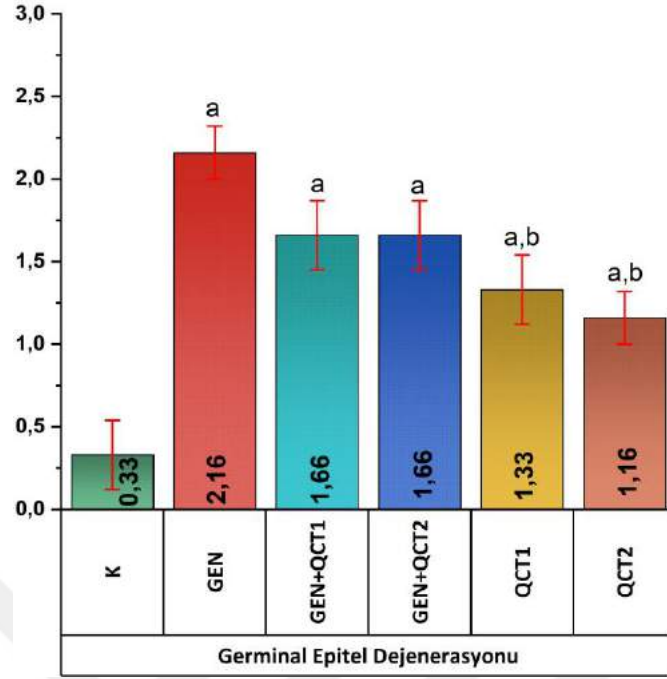
	K	GEN	GEN+ QCT1	GEN+ QCT2	QCT1	QCT2
Foliküler Hücre Dejenerasyonu	0.33 ±0.21	1.83 ±0.16 ^a	1.50 ±0.22 ^a	1.33 ±0.21 ^a	0.66 ±0.21 ^{b,c}	0.66 ±0.21 ^{b,c}
Vasküler Konjesyon	0.83 ±0.16	2.00 ±0.36 ^a	1.83 ±0.16 ^a	1.33 ±0.21	1.33 ±0.21	1.66 ±0.21 ^a
Germinal Epitel Dejenerasyonu	0.33 ±0.21	2.16 ±0.16 ^a	1.66 ±0.21 ^a	1.66 ±0.21 ^a	1.33 ±0.21 ^{a,b}	1.16 ±0.16 ^{a,b}
Inflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu	0.16 ±0.16	1.16 ±0.16 ^a	1.16 ±0.16 ^a	0.83 ±0.16 ^a	0.50 ±0.22 ^{b,c}	0.83 ±0.16 ^a
Fibrozis	0.33 ±0.21	2.33 ±0.21 ^a	1.50 ±0.22 ^{a,b}	1.33 ±0.21 ^{a,b}	0.66 ±0.21 ^{b,c}	0.66 ±0.21 ^{b,c}
Değerler ortalama±standart hata (mean±SE) şeklinde verildi. ^a :K, ^b : GEN, ^c :GEN+QCT1, ^d :GEN+QCT2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).						



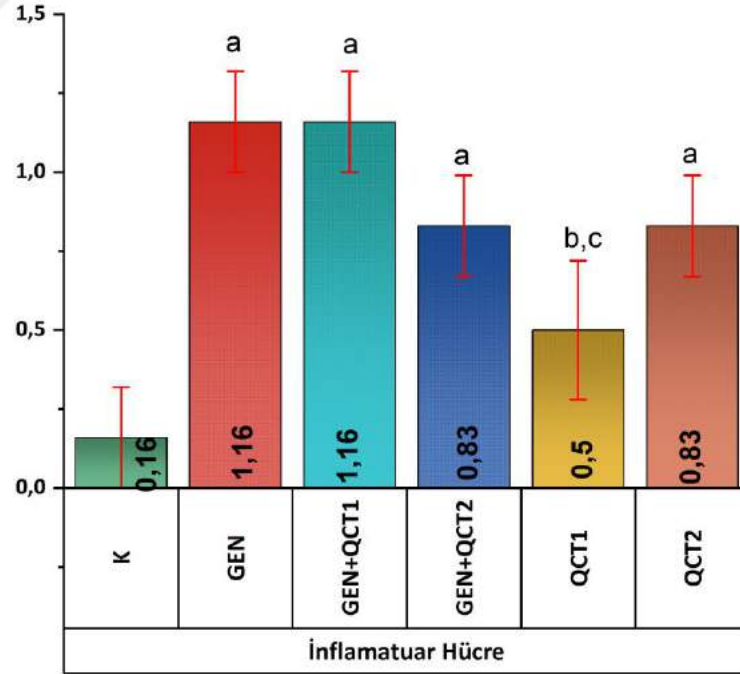
Şekil 13. Gruplara ait ovaryum foliküler hücre dejenerasyonu istatistiksel grafiği. Değerler ortalama±standart hata (mean±SE) şeklinde verildi. a:K, b:GEN, c:GEN+QCT1, grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



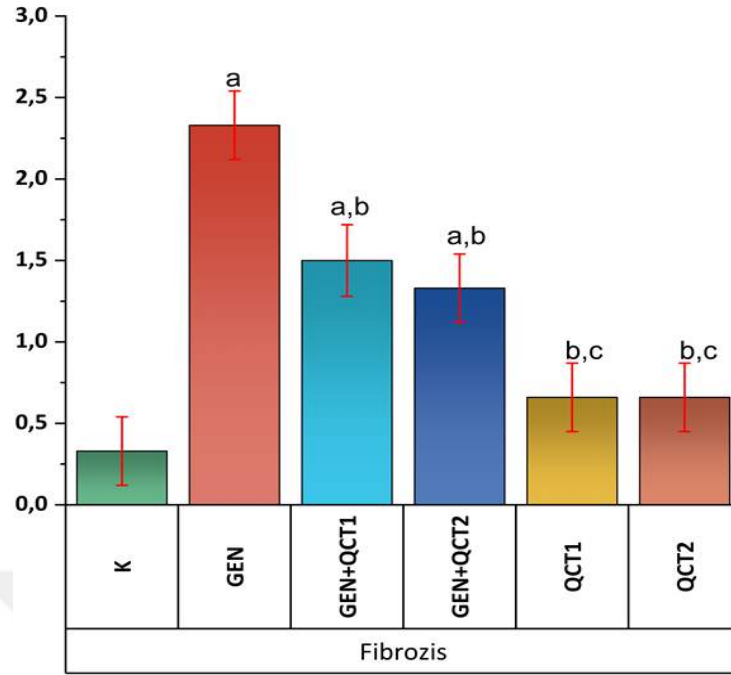
Şekil 14. Gruplara ait vasküler konjesyon istatistiksel grafiği. Değerler ortalama±standart hata (mean±SE) şeklinde verildi. a:K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



Şekil 15. Gruplara ait germinal epitel dejenerasyonu istatistiksel grafiği. Değerler ortalama $\pm$ standart hata (mean $\pm$ SE) şeklinde verildi. a:K, b:GEN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



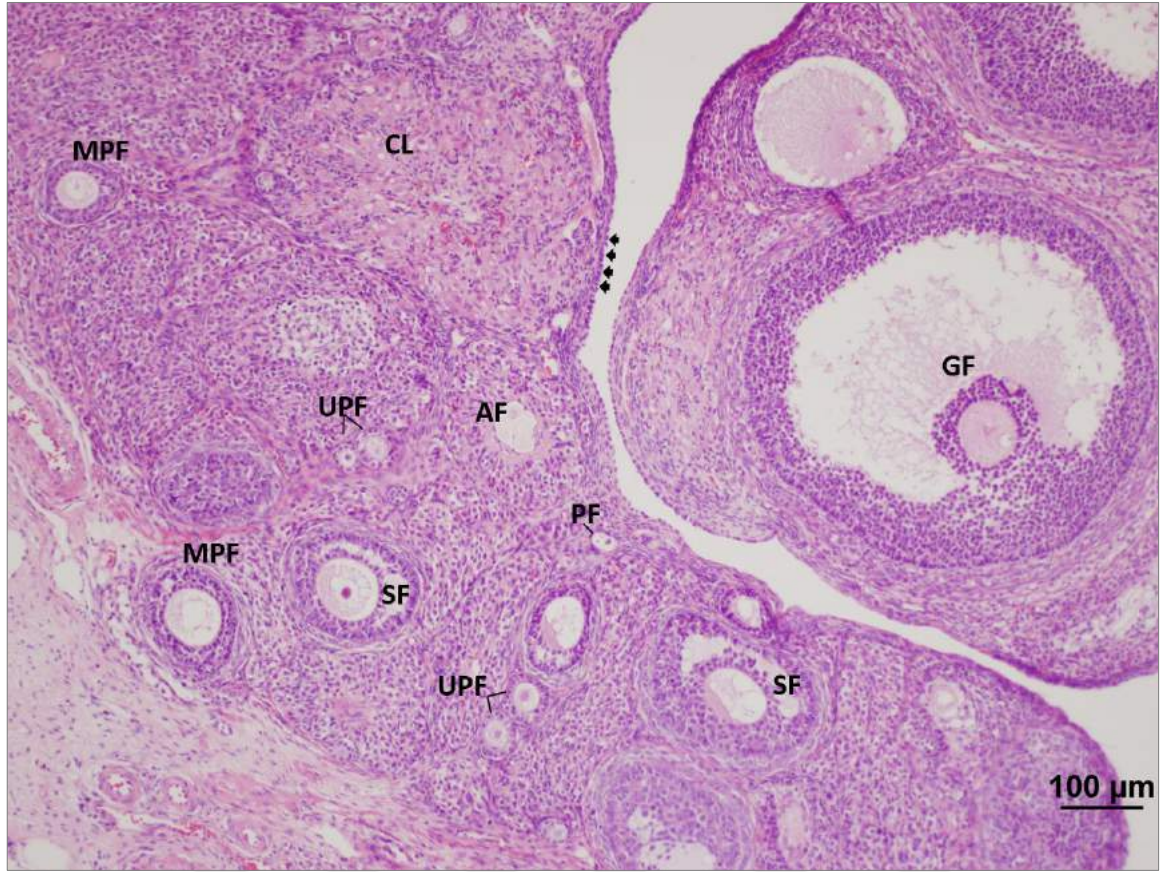
Şekil 16. Gruplara ait inflamatuvar hücre istatistiksel grafiği. Değerler ortalama $\pm$ standart hata (mean $\pm$ SE) şeklinde verildi. a:K, b:GEN, c:GEN+QCT1, grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



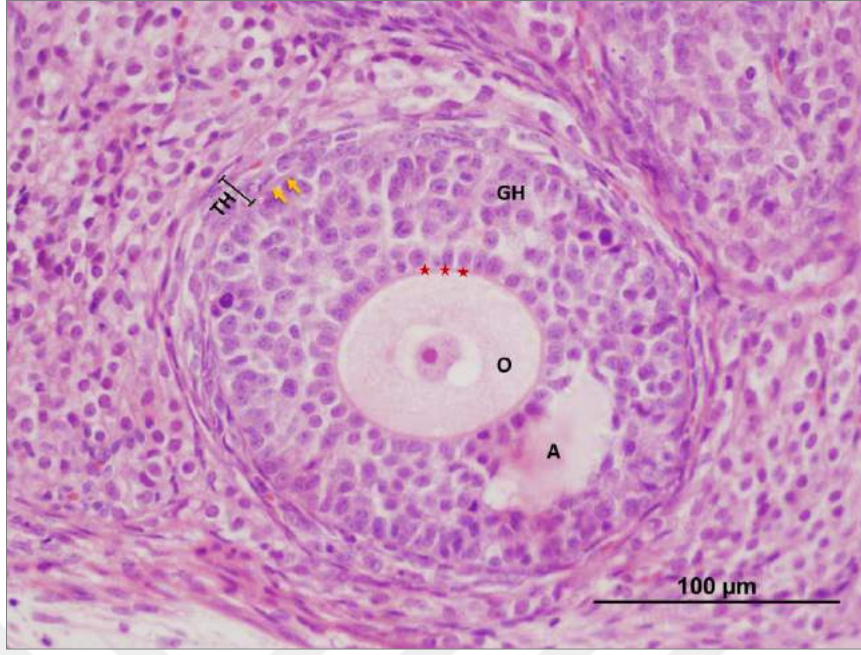
Şekil 17. Gruplara ait fibrozis istatistiksel grafiği. Değerler ortalama $\pm$ standart hata (mean $\pm$ SE) şeklinde verildi. a:K, b:GEN, c:GEN+QCT1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).

4.3.2. Hematoksilen Eozin Boyama ile Histolojik Değerlendirme

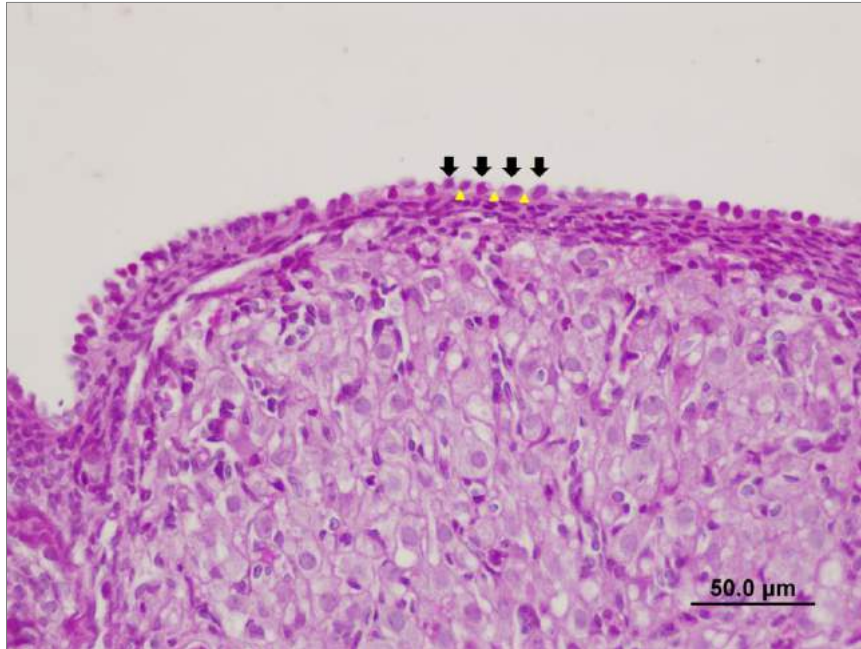
Tüm gruplara ait preparatlar ışık mikroskop altında farklı büyütmelemlerde değerlendirildi. Buna göre; K grubuna ait ovaryum doku kesitlerinde normal ovaryum histolojik yapısı izlendi. Ovaryum yüzeyinde tek katlı kübik yapıda düzgün diziliimli germinal epitel yapısı izlendi. Ovaryum korteksinde çok sayıda ovaryum follikül yapısı izlendi (Resim 9-11).



Resim 9. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinin 10X IM görüntüsü. Germinal epitel yapısı siyah oklarla belirtilmiştir. Resimdeki ovaryum kesitinin korteksinde primordiyal folikül (PF), unilaminar primer folikül (UPF), multilaminar primer folikül (MPF), sekonder folikül (SF), Graaf folikülü (GF) ve atretik folikül (AF) gibi gelişimin farklı evrelerine ait birçok folikül gözlenmektedir (H&E, 100X).

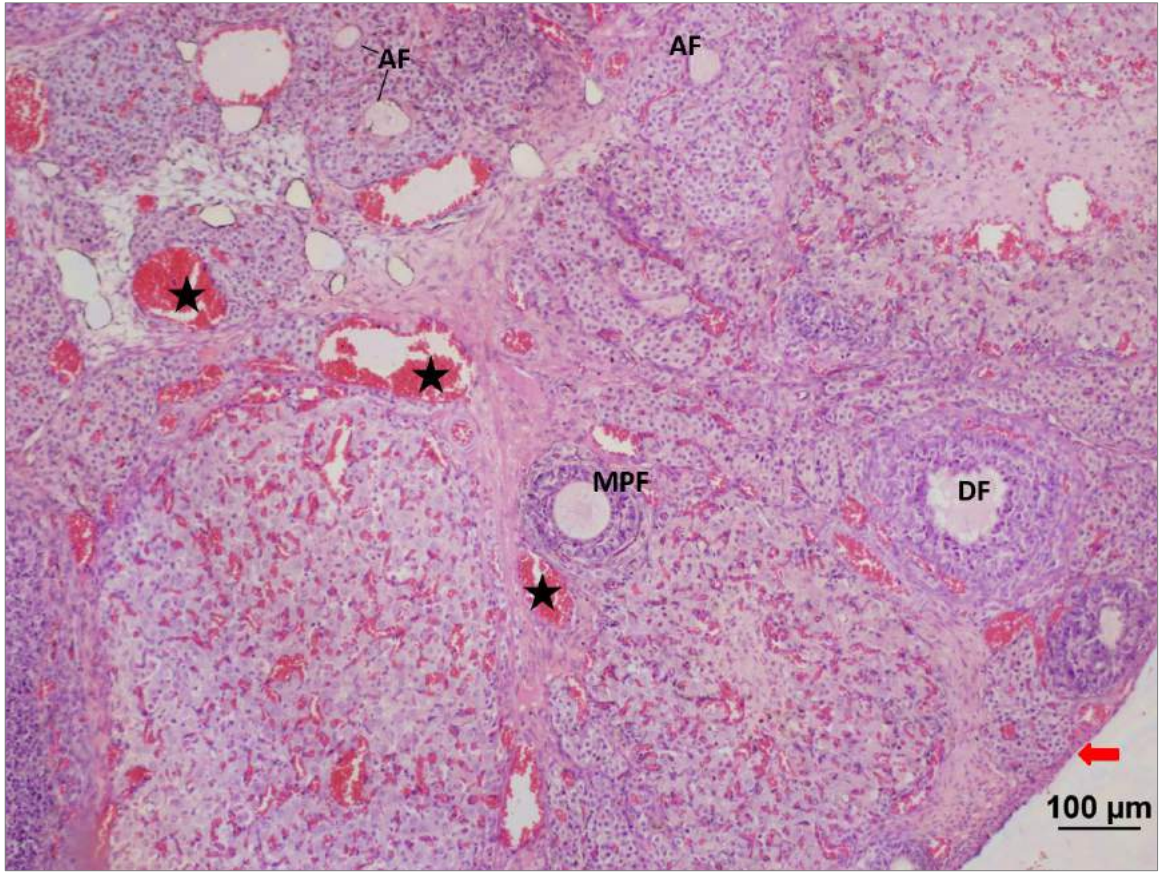


Resim 10. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Sekonder foliküle ait görüntüde oosit (O) etrafında kırmızı yıldız ile belirtilen zona pellusida yapısı, granüloza hücreleri (GH) arasında oluşan antrum (A) yapısı, turuncu oklarla belirtilen bazal membran ve folikülü çevreleyen teka hücreleri (TH) görülmektedir (H&E, 400X).

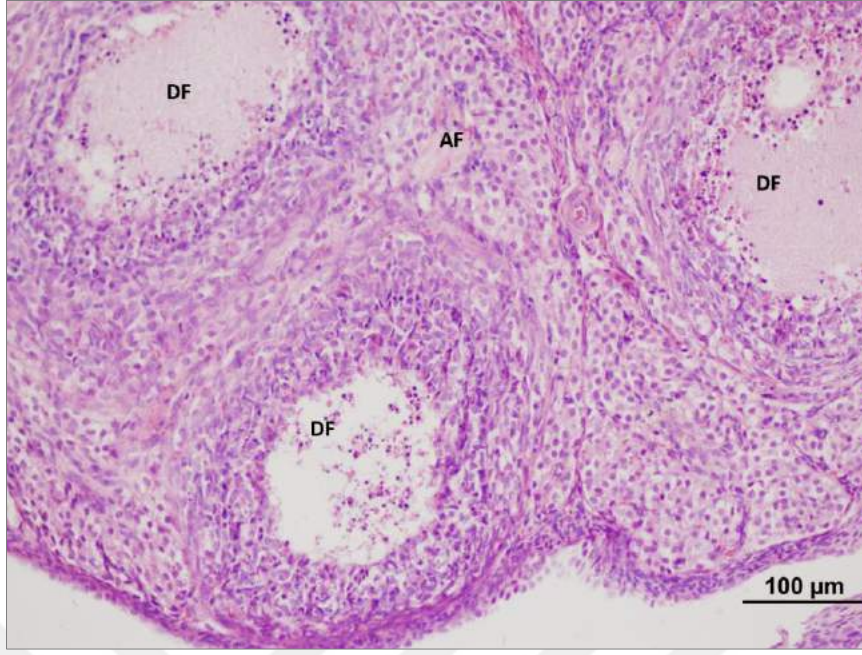


Resim 11. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Ovaryumu çevreleyen germinal epitel yapısı siyah oklarla, tunika albuginea yapısı da sarı üçgenlerle belirtilmiştir (H&E, 400X).

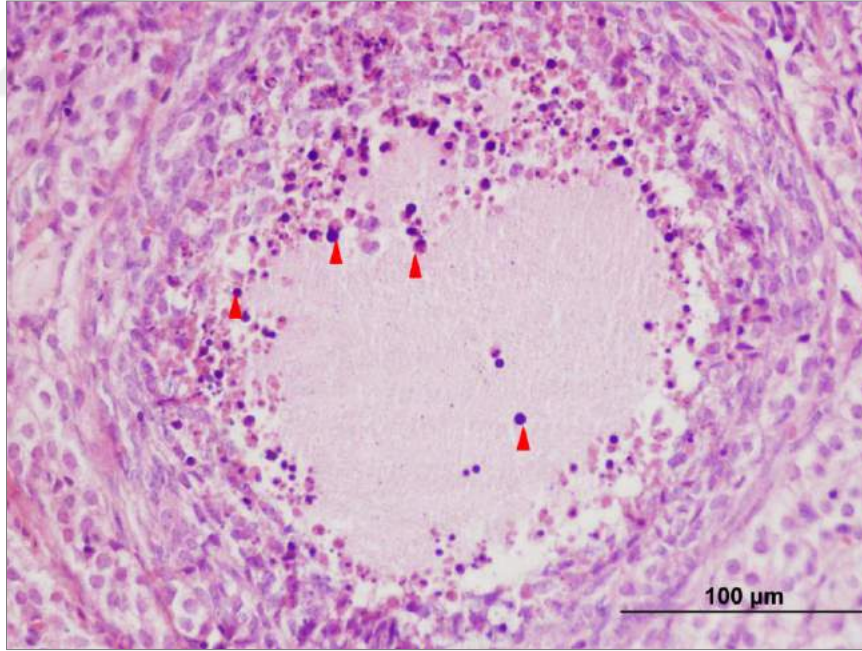
GEN grubuna ait ovaryum doku kesitlerinde, germinal epitel yapısında yer yer düzensizlikler, kayıplar ve epitel yüksekliğinde azalma izlendi. Medulla ve korteksde yaygın olarak vasküler konjesyon izlendi. Medulla ve korteksde yer yer inflamatuvar hücre infiltrasyonu mevcut idi. Follikül hücrelerinde dejeneratif değişiklikler ve lümene dökülmeler izlendi. Follikül yapısı değerlendirildiğinde atreziye giden follikül oldukça fazla sayıda gözlemlendi (Resim 12-14).



Resim 12. GEN grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Doku kesitinde vasküler konjesyon bölgeleri siyah yıldız ile belirtilmiştir. Görüntüde atretik foliküller (AF), dejeneratif folikül (DF) ve multilaminar primer folikül (MPF) yapıları görülmektedir (H&E, 100X).

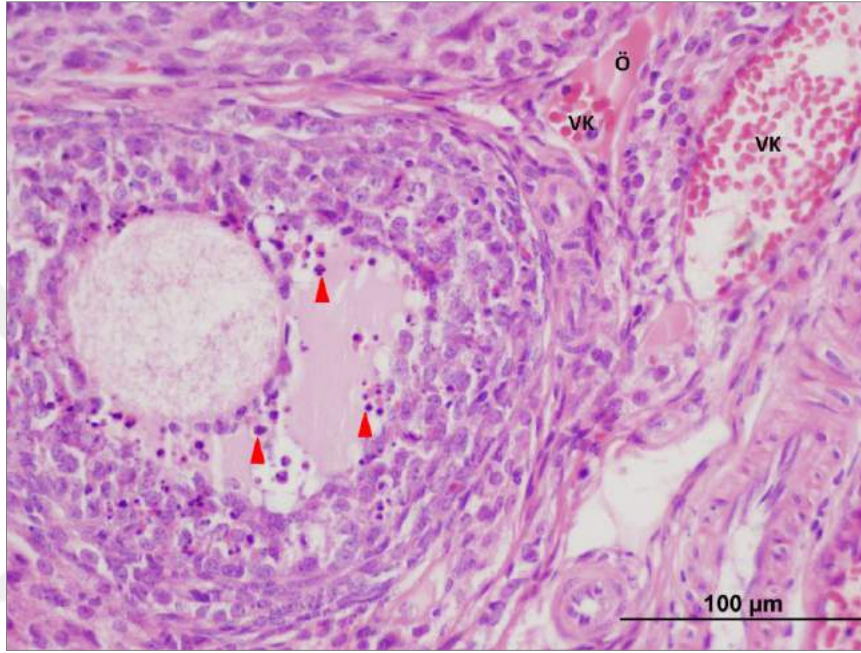


Resim 13. GEN grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Doku kesitinde birçok dejeneratif folikül (DF) görülmektedir (H&E, 200X).

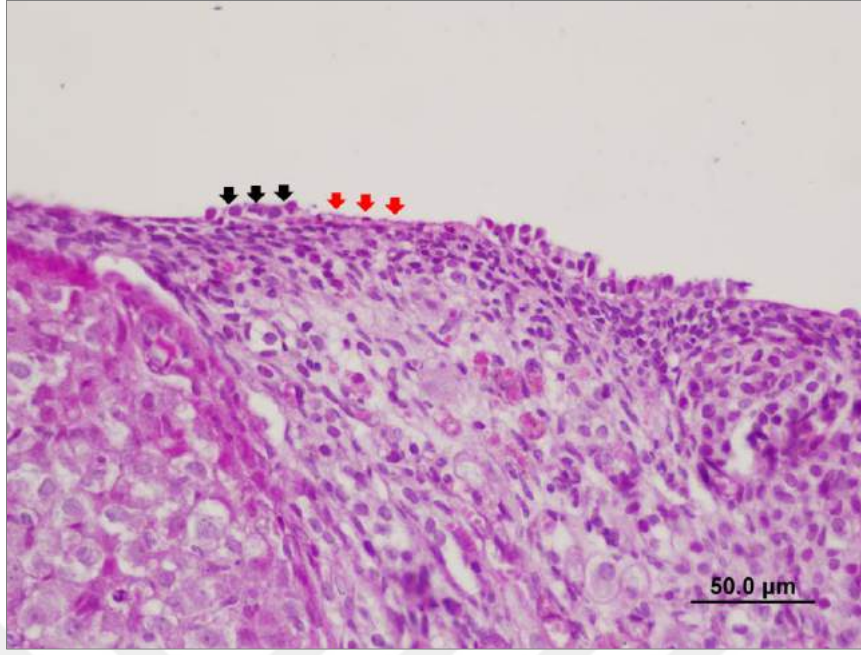


Resim 14. GEN grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Dejeneratif foliküle ait görüntüde folikül lümenine dökülen dejenere hücreler kırmızı ok başı ile belirtilmiştir (H&E, 400X).

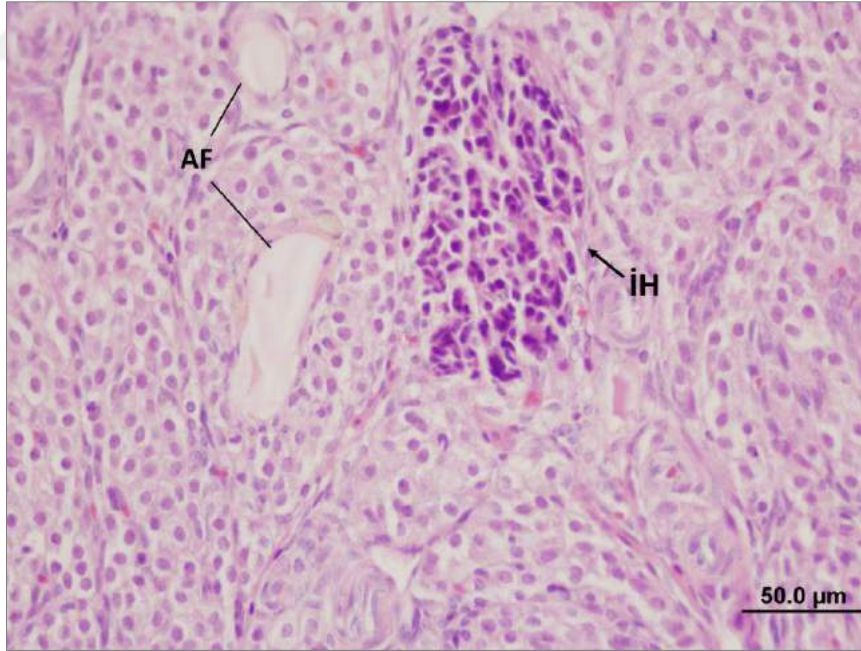
GEN+QCT1 grubuna ait ovaryum doku kesitlerinde, genel histolojik yapı değerlendirildiğinde germinal epitel hemen hemen bütünlüğünü koruyordu. Yer yer germinal epitel kaybı ve düzensizlikleri izlendi. Medulla ve kortekste yer yer vasküler konjesyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlendi. Folliküllerin granüloza hücrelerinde dejeneratif değişiklikler mevcut idi (Resim 15-17).



Resim 15. GEN+QCT1 grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Doku kesitinde kırmızı ok başı ile belirtilen folikül lümenine dökülmüş dejenere hücrelerin yanı sıra vasküler konjesyon (VK) ve Ödem (Ö) oluşumu da gösterilmiştir (H&E, 400X).

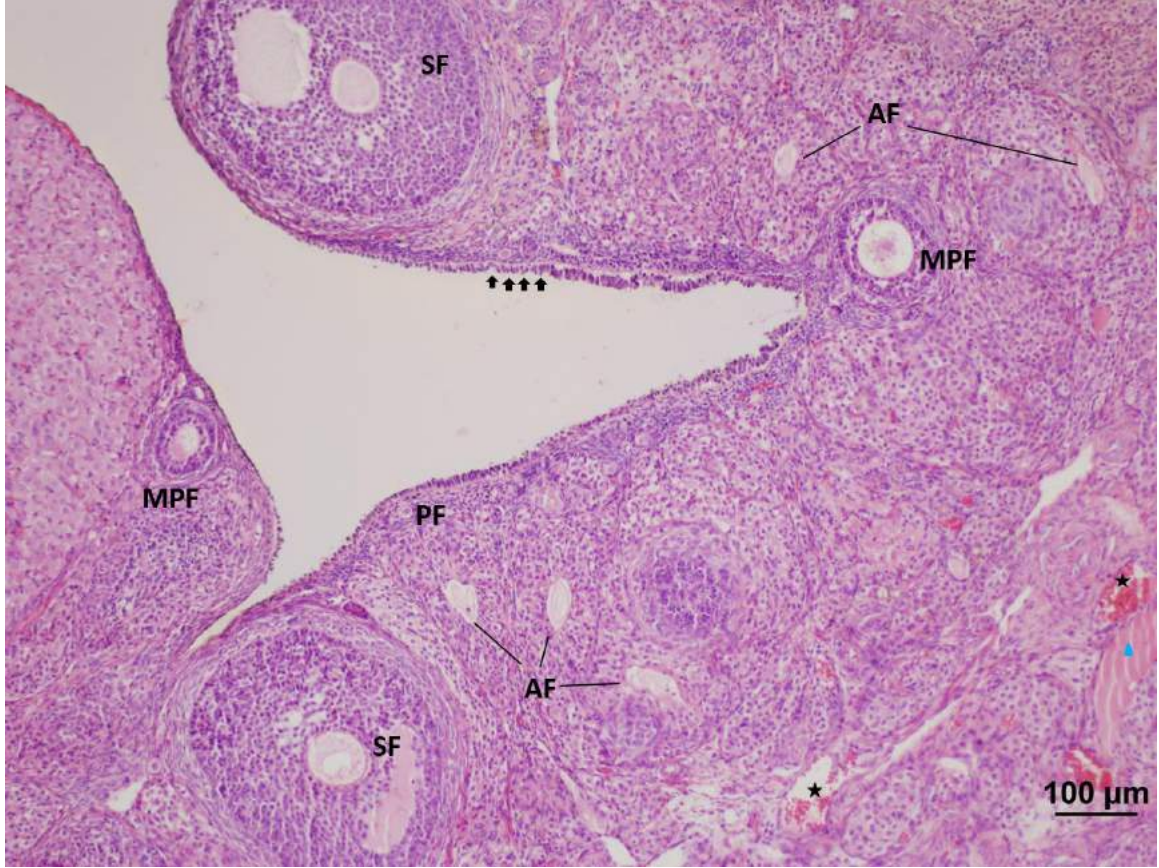


Resim 16. GEN+QCT1 grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Ovaryumu çevreleyen germinal epitel siyah oklarla belirtilmiş ve yer yer döküldüğü kısımlar kırmızı oklarla gösterilmiştir (H&E, 400X).

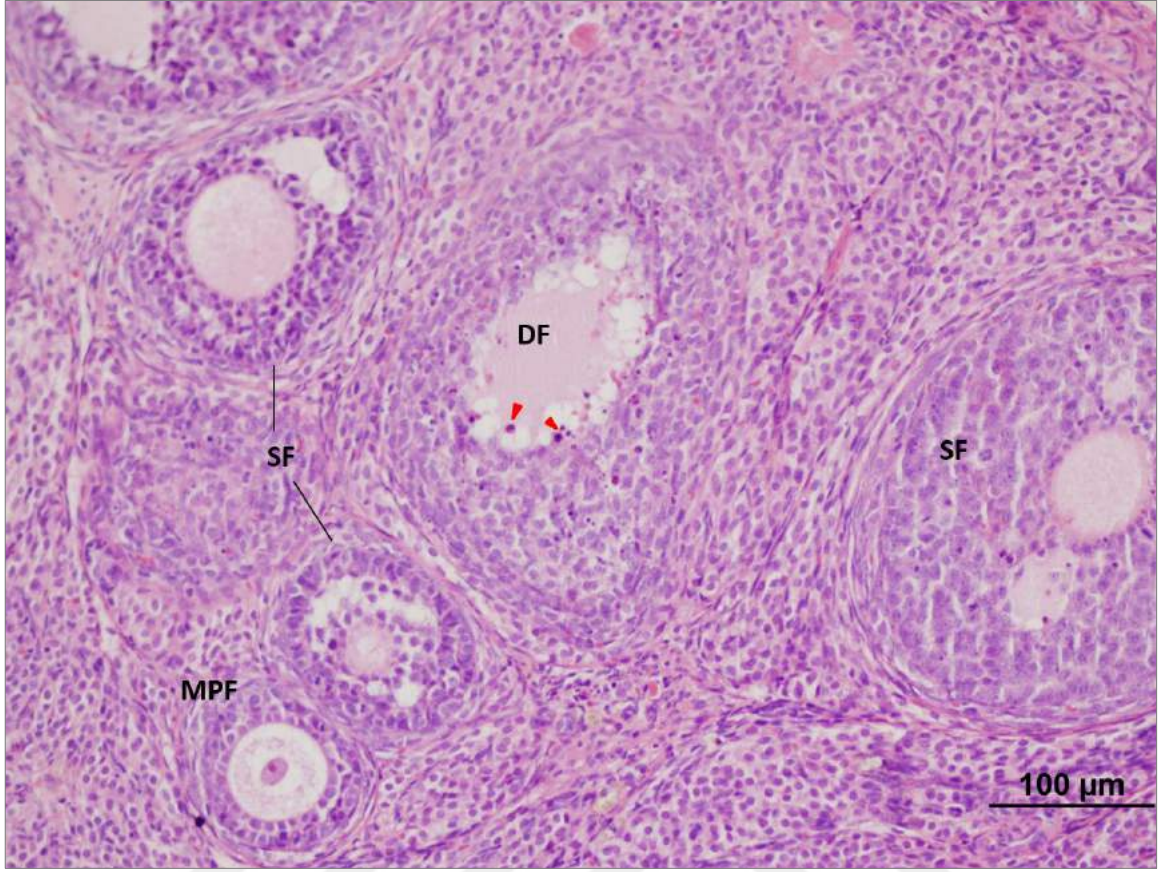


Resim 17. GEN+QCT1 grubuna ait ovaryum kesitinin IM. Kesitte inflamatuvar hücre infiltrasyonu (IH) ve atretik foliküller (AF) görülmektedir (H&E, 400X).

GEN+QCT2 grubuna ait ovaryum doku kesitlerinde, germinal epitel bütünlüğünü koruyordu. 2. Grup ve 3. Grup ovaryum kesitlerine nazaran daha az yoğunlukta olsa da dejeneratif foliküllere ve vasküler konjesyona rastlandı.(Resim 18, 19).

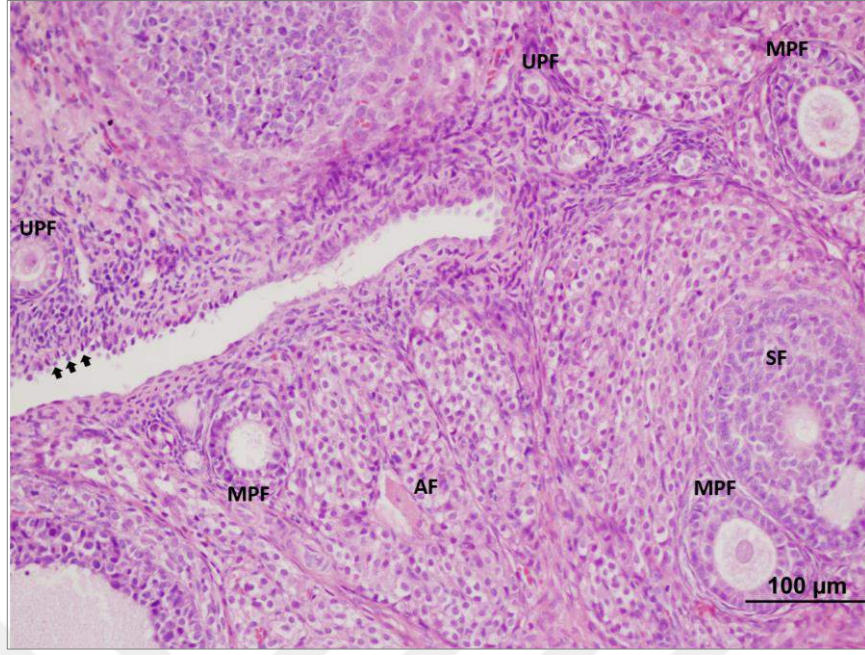


Resim 18. GEN+QCT2 grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Germinal epitel yapısı siyah oklarla belirtilmiştir. Kesitte sekonder folikül (SF), multilaminar primer folikül (MPF), primordiyal folikül (PF) ve atretik folikül (AF) yapıları görülmektedir. Vasküler konjesyon bölgeleri siyah yıldız ile ödemli bölgeler mavi üçgen ile işaretlenmiştir (H&E, 100X).

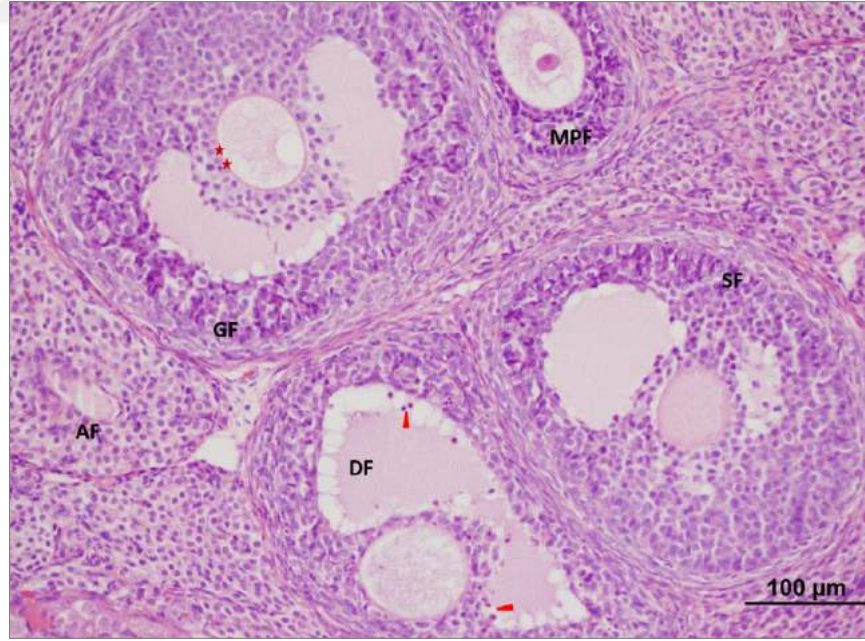


Resim 19. GEN+QCT2 grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Kesitte sekonder folikül (SF), multilaminar primer folikül (MPF) ve dejeneratif folikül (DF) yapıları görülmektedir. Lümeneye dökülen dejeneratif hücreler kırmızı ok başı ile belirtilmiştir (H&E, 200X).

QCT1 grubuna ait ovaryum doku kesitlerinde, germinal epitel normale yakın morfolojide izlendi. Az miktarda düzensizlikler ve kayıplar izlendi. Vasküler konjesyon çok az izlendi. Kontrol grubuna benzer morfolojide izlendi. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu ve folliküllerin granüloza hücrelerinde dejeneratif değişiklikler çok az olarak izlendi (Resim 20, 21).

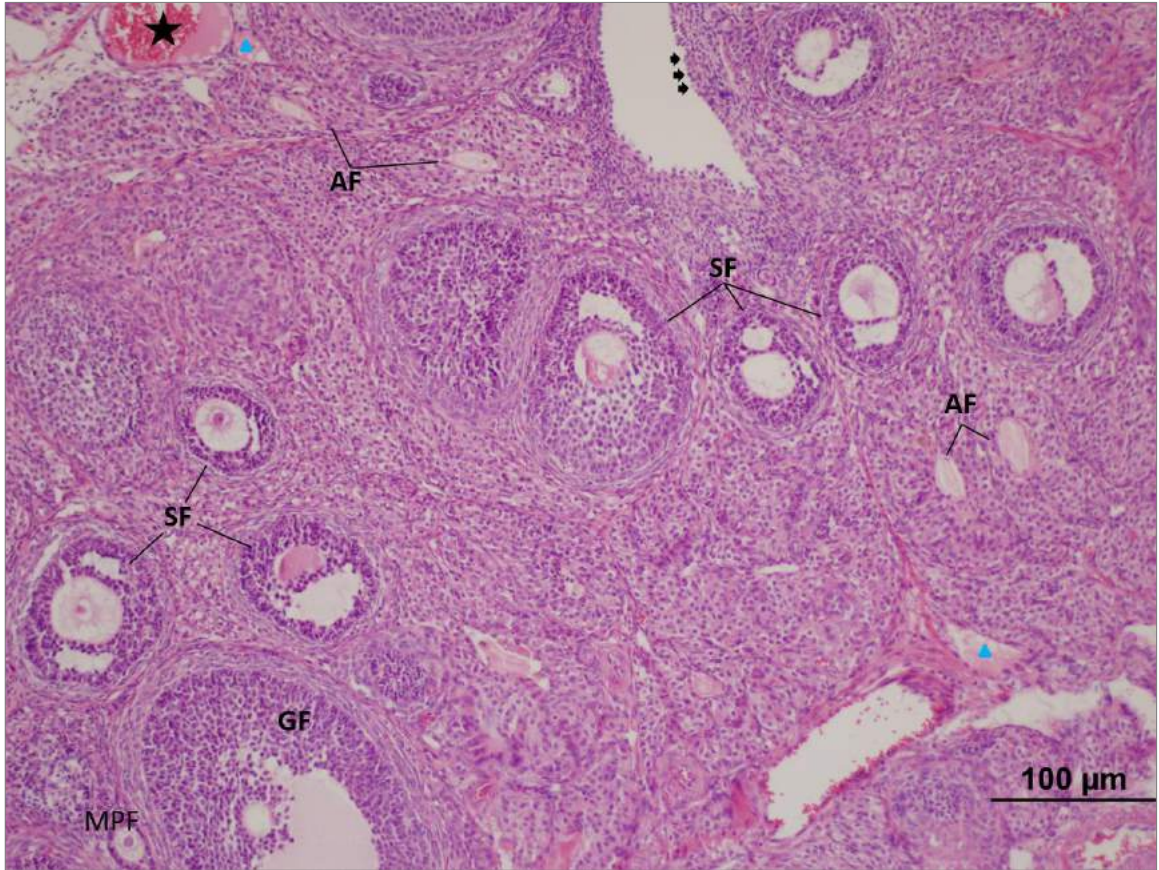


Resim 20. QCT1 grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Germinal epitel siyah oklarla belirtilmiştir. Doku kesitinde sekonder folikül (SF), multilaminar primer folikül (MPF), unilaminar primer folikül (UPF) ve atretik foliküle (AF) rastlanmıştır (H&E, 200X).

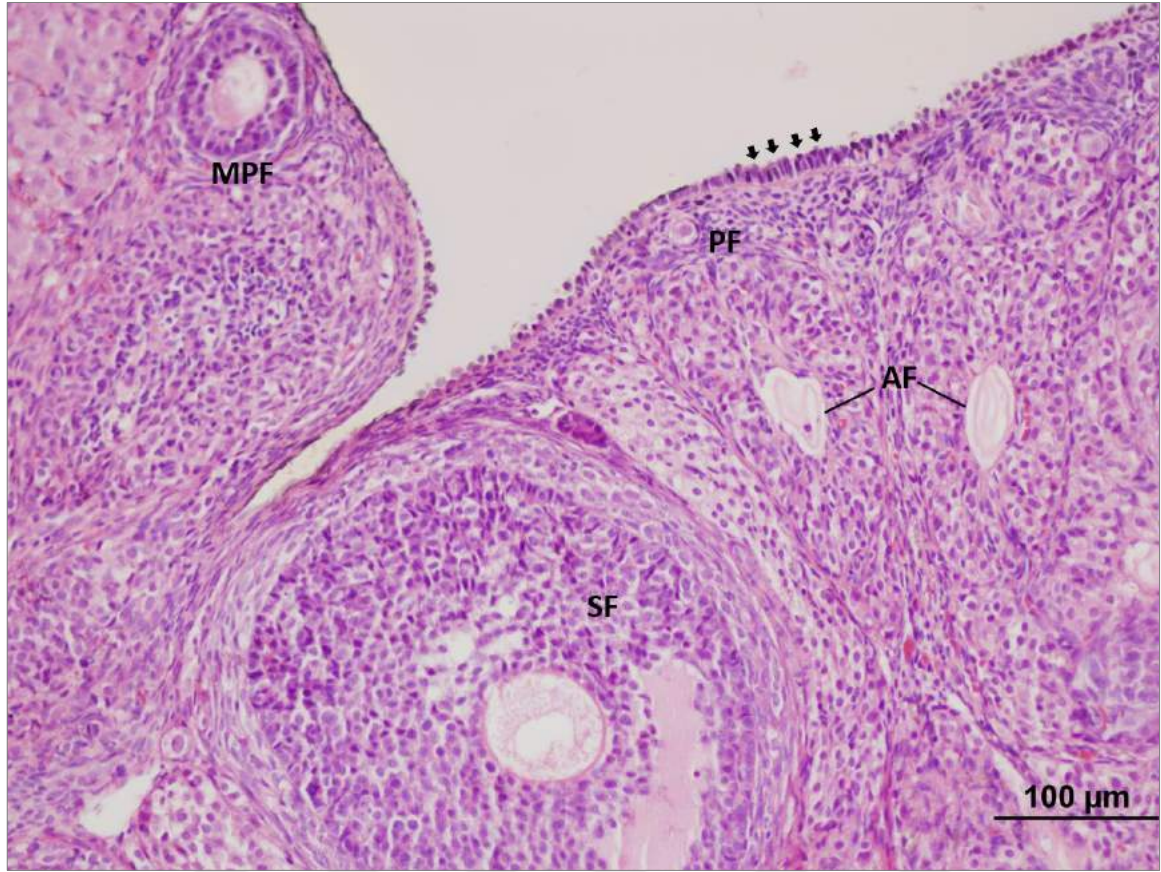


Resim 21. QCT1 grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Doku kesitinde Graaf folikülü (GF), sekonder folikül (SF), multilaminar primer folikül (MPF), atretik folikül (AF) ve dejeneratif folikül (DF) görülmektedir. Dejeneratif hücreler kırmızı ok başı ile zona pellusida yapısı bordo yıldızlarla işaretlenmiştir (H&E, 400X).

QCT2 grubuna ait ovaryum doku kesitlerinde, germinal epitel normale yakın morfolojide izlendi. Vasküler konjesyon ve İnflamatuar hücre infiltrasyonu çok az izlendi. Ancak QCT1 grubuna göre biraz daha fazla olarak izlendi. Folliküllerin granüloza hücrelerinde dejeneratif değişiklikler çok az olarak izlendi (Resim 22, 23).



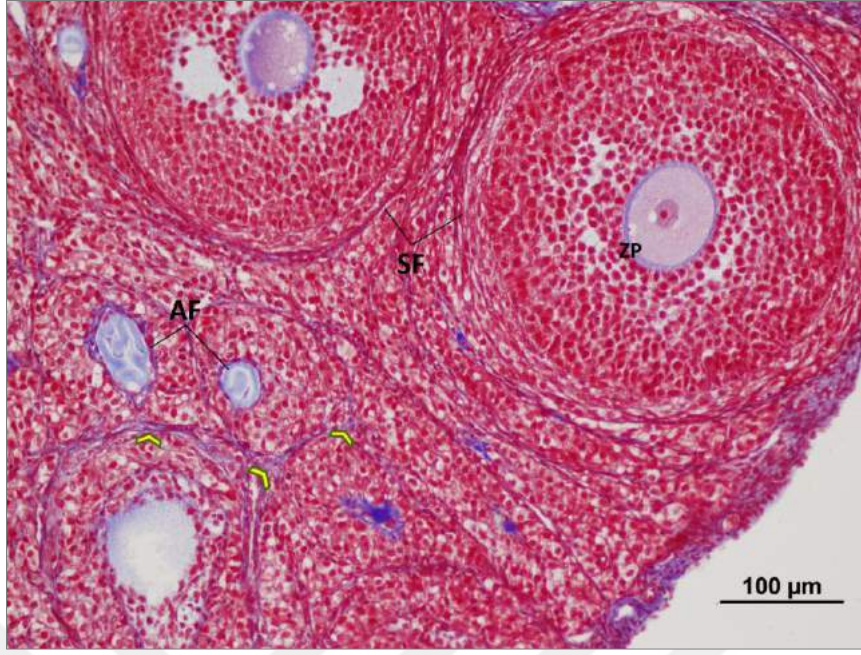
Resim 22. QCT2 grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Germinal epitel siyah oklarla belirtilmiştir. Doku kesitinde yoğunlukla sekonder folikül (SF) ve atretik folikül (AF) olmak üzere Graaf folikül (GF), multilaminar primer foliküle (MPF) rastlanmıştır. Vasküler konjesyon siyah yıldız ile ödem oluşan bölgeler mavi üçgen ile gösterilmiştir (H&E, 100X).



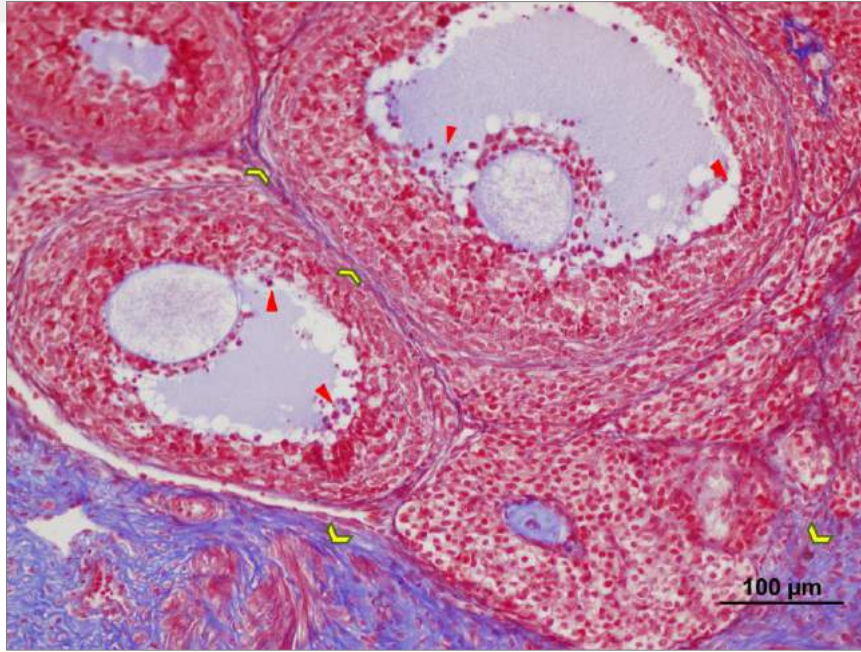
Resim 23. QCT2 grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Germinal epitel siyah oklarla belirtilmiştir. Kesitte multilaminar primer folikül (MPF), sekonder folikül (SF), primordiyal folikül (PF) ve atretik folikül (AF) yapıları görülmektedir (H&E, 200X).

4.3.3. Masson Trikrom Boyama ile Histopatolojik Değerlendirme

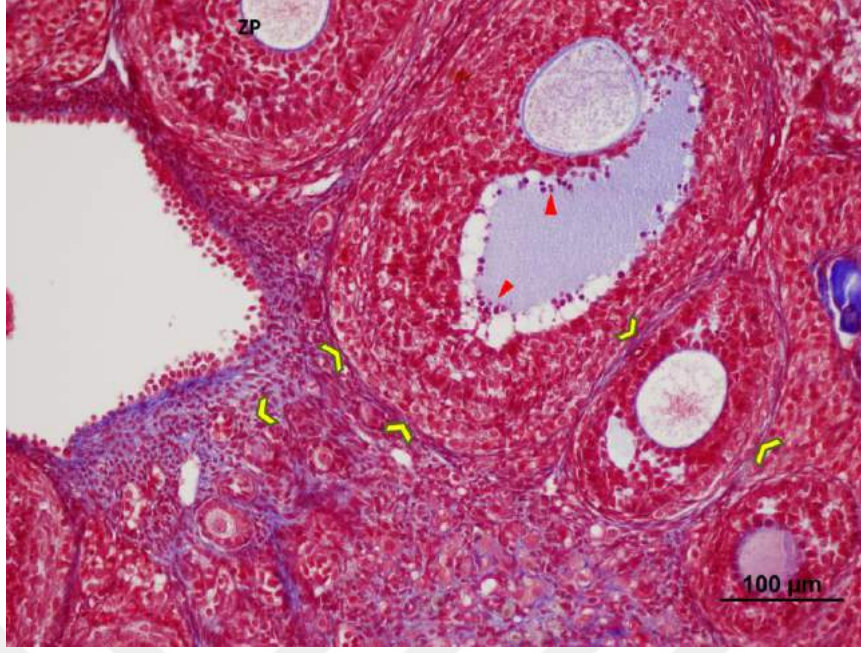
Masson Trikrom boyama yapılan ovaryum kesitleri fibrozis açısından yarıkantitatif olarak değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda GEN, GEN+QCT1 ve GEN+QCT2 grubunda kontrol grubuna göre fibrozisin anlamlı olarak arttığı izlendi. Yine GEN+QCT1, GEN+QCT2, QCT1 ve QCT2 gruplarında GEN grubuna göre anlamlı olarak azalmış olarak izlendi. QCT1 ve QCT2 gruplarında GEN+QCT1 grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. GEN grubunda fibrozis özellikle medullada ve foliküller etrafında izlendi. GEN+QCT1 ve GEN+QCT2 gruplarında yine özellikle folliküler etrafında fibrozis izlendi. Ancak GEN grubuna göre azalmıştı. QCT1 ve QCT2 gruplarında kontrol grubuna göre daha fazla fibrozis izlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Resim 24-29).



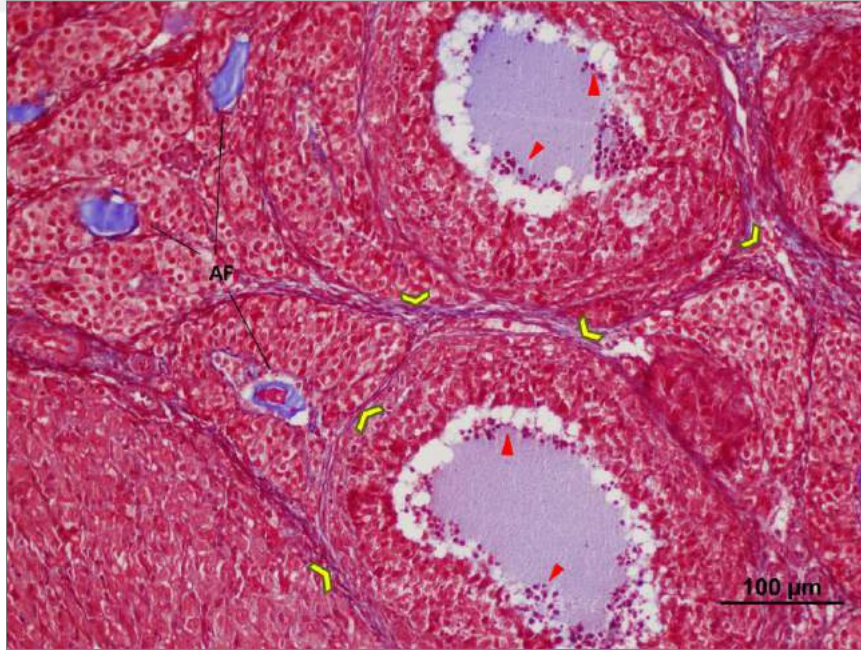
Resim 24. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Sekonder foliküle (SF) ait görüntüde mavi boyanmış zona pellusida (ZP) yapısı görülmektedir. Atretik foliküllerin (AF) etrafında mavi renkte boyanmış az fibrozis (sarı ok) görülmektedir (Masson Trikrom, 200X).



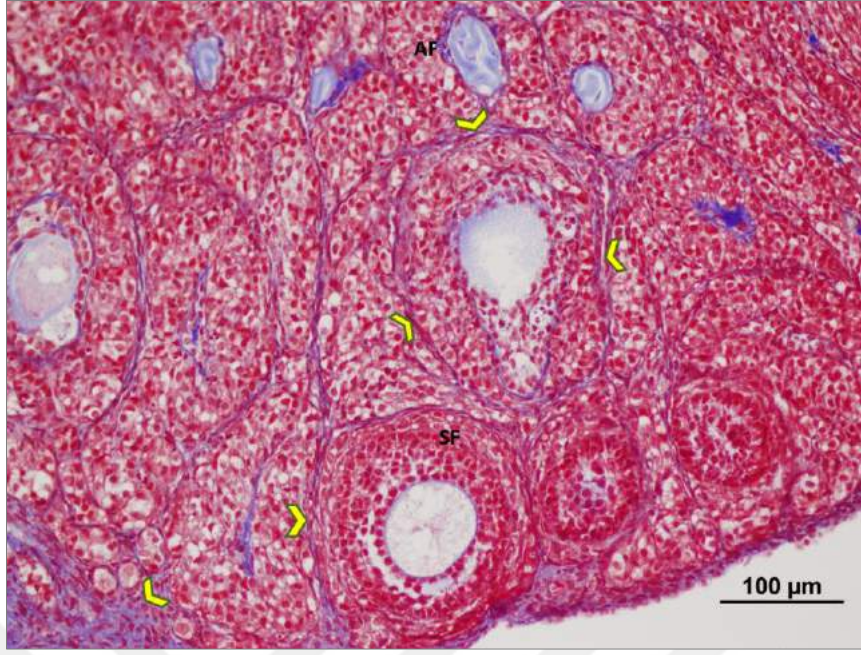
Resim 25. GEN grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Doku kesitinde lümene dökülmüş dejeneratif hücreler (kırmızı ok başı) görülmektedir. Ovaryum medullasında ve foliküllerin etrafında artmış fibrozis (sarı ok) görülmektedir (Masson Trikrom, 200X).



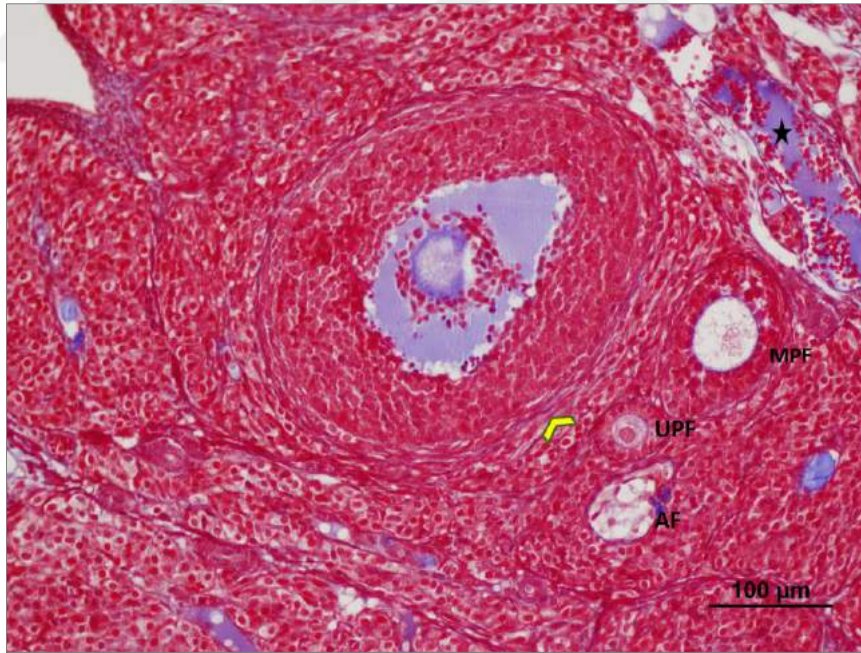
Resim 26. GEN+QCT1 grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Kesitte ovaryum etrafında mavi boyanmış zona pellusida yapıları ve Graaf folikülde lümene dökülmüş dejeneratif hücreler (kırmızı ok başı) görülmektedir. Ovaryum medullasında ve foliküllerin etrafında nispeten azalmış fibrozis (sarı ok) görülmektedir (Masson Trikrom, 200X).



Resim 27. GEN+QCT 2 grubuna ait ovaryum kesitinin 20X IM görüntüsü. Doku kesitinde atretik foliküller (AF), dejeneratif foliküller ve lümene dökülmüş dejeneratif hücreler (kırmızı ok başı) görülmektedir. Foliküllerin etrafında fibrozis (sarı ok) görülmektedir (Masson Trikrom, 200X).



Resim 28. QCT1 grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Doku kesitinde atretik foliküller (AF) sekonder folikül (SF) görülmektedir. Foliküllerin etrafında fibrozis (sarı ok) görülmektedir (Masson Trikrom, 200X).



Resim 29. QCT2 grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Doku kesitinde Graaf folikül, unilaminar primer folikül (UPF), multilaminar primer folikül (MPF) ve atretik folikül (AF) görülmektedir. Vasküler konjesyon (siyah yıldız) ve foliküllerin etrafında çok az miktarda fibrozis (sarı ok) görülmektedir (Masson Trikrom, 200X).

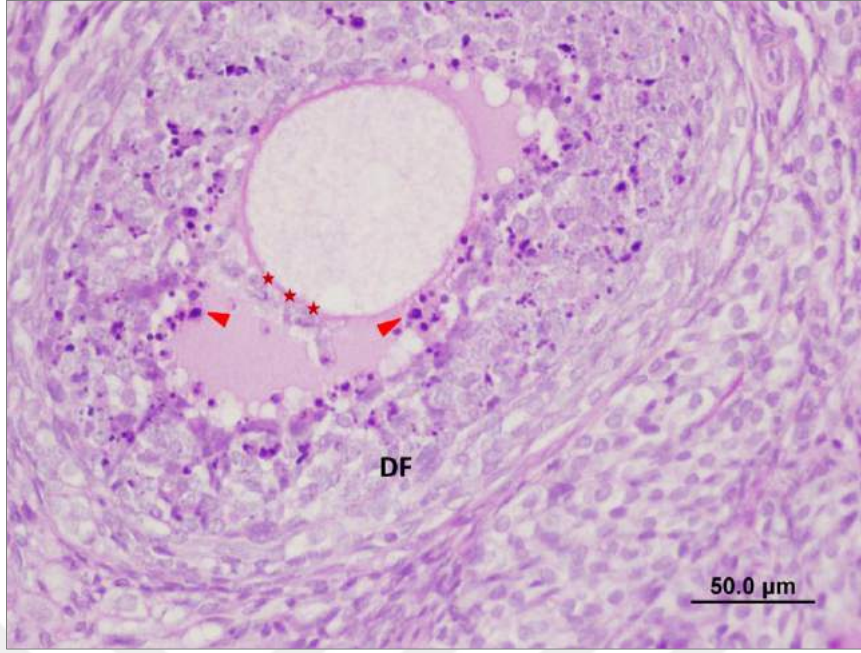
4.3.4. PAS Boyama ile Histopatolojik Değerlendirme

Periyodik asit-Shift boyama yapılan ovaryum kesitlerinde gruplarda zona pellusida ve bazal membran değerlendirildi. GEN ve GEN+QCT1 grubunda zona pellusida zayıf PAS (+) boyanma gösterdi. Zona pellusidada yer yer bütünlüğünü kaybetme izlendi. Diğer gruplarda zona pellusida PAS (+) olarak boyandı ve zona pellusida bütünlüğü korundu. Follikülleri çevreleyen bazal membranın PAS (+) liği tüm gruplarda aynı şiddette izlendi. Gruplar arasında farklılık izlenmedi (Resim 30-35).

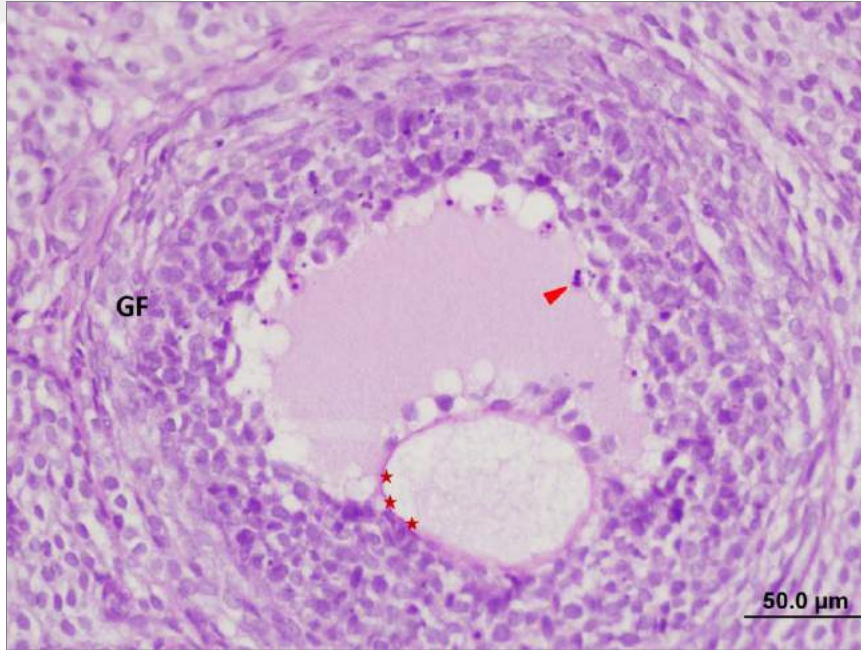
9



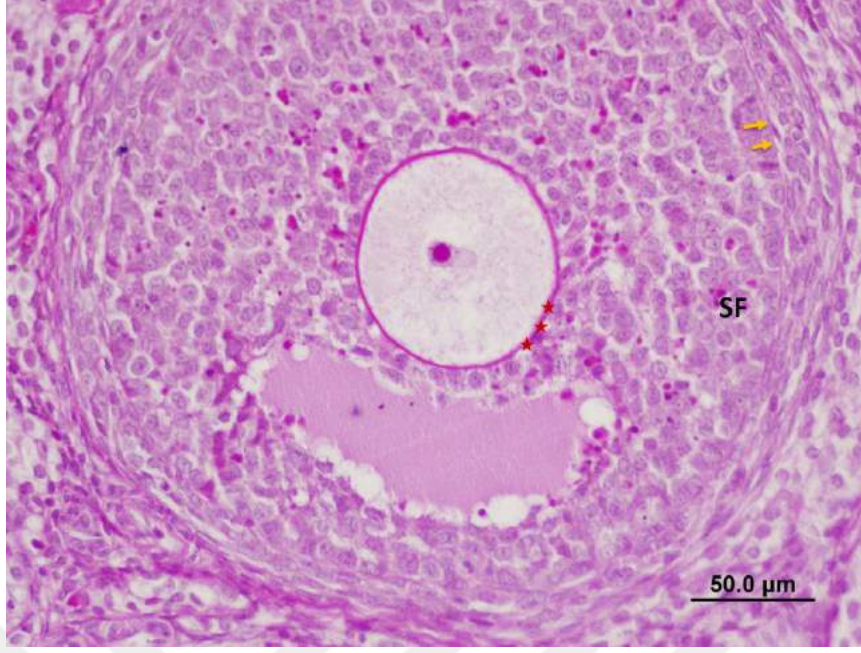
Resim 30. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Sekonder foliküle (SF) ait zona pellusida yapısı (kırmızı yıldız) görülmektedir (PAS, 400X).



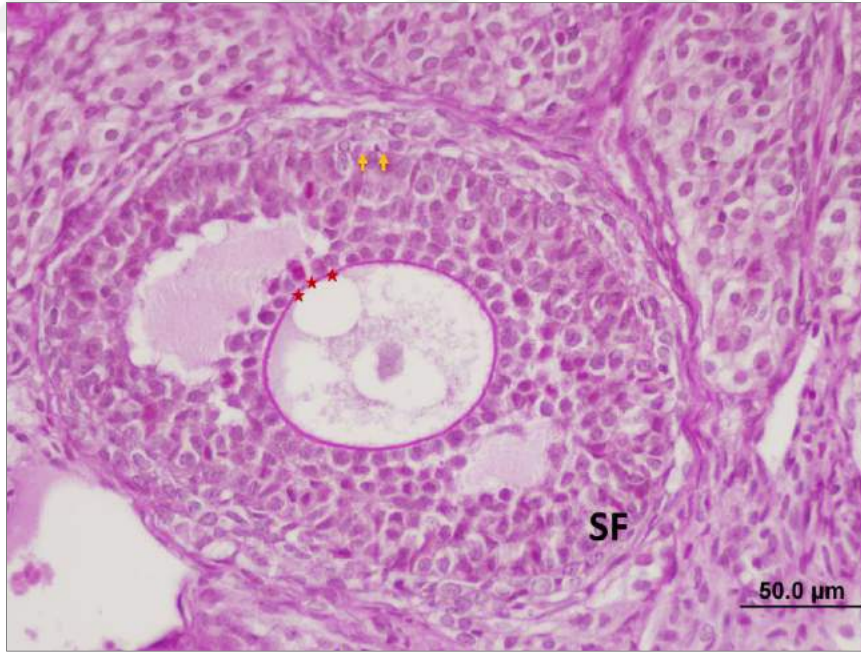
Resim 31. GEN grubuna ait ovaryum dokusunun IM görüntüsü. Dejeneratif foliküle (DF) ait bu görüntüde, zayıf PAS (+) boyanma gösteren zona pellusida yapısı (kırmızı yıldız) ve lümene dökülmüş dejeneratif hücreler (kırmızı ok başı) görülmektedir (PAS, 400X).



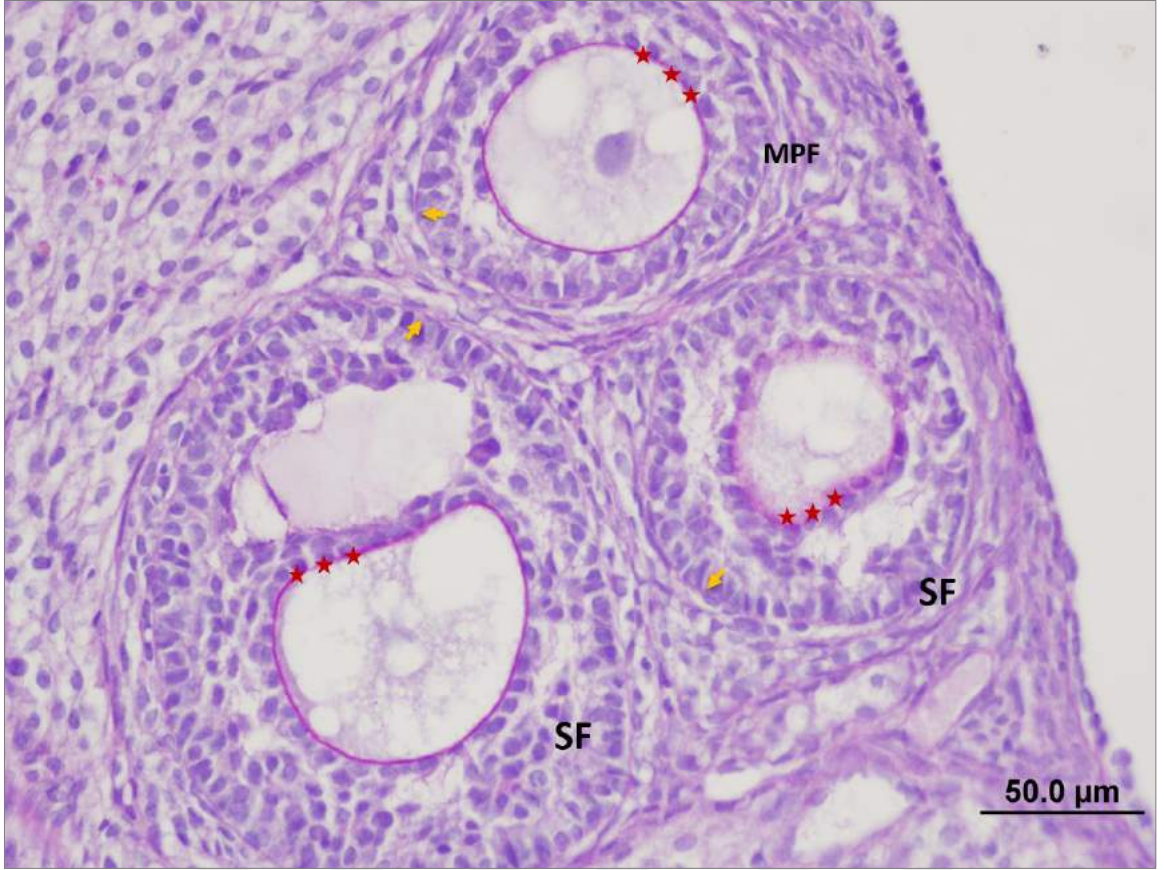
Resim 32. GEN+QCT1 grubuna ait ovaryum dokusunun IM görüntüsü. Graaf foliküle (GF) ait bu görüntüde, yer yer dağılmış, zayıf PAS (+) boyanma gösteren zona pellusida yapısı (kırmızı yıldız) ve lümene dökülmüş dejeneratif hücreler (kırmızı ok başı) görülmektedir (PAS, 400X).



Resim 33. GEN+QCT2 grubuna ait ovaryum dokusunun IM görüntüsü. Sekonder folikülüne (SF) ait bu görüntüde, bütünlüğünü korumuş, PAS (+) boyanma gösteren zona pellusida yapısı (kırmızı yıldız) ve bazal membran (turuncu ok) görülmektedir (PAS, 400X).



Resim 34. QCT1 grubuna ait ovaryum dokusunun IM görüntüsü. Sekonder folikül (SF) görüntüsünde bütünlüğünü korumuş, PAS (+) boyanma gösteren zona pellusida yapısı (kırmızı yıldız) ve bazal membran (turuncu ok) yapısı görülmektedir (PAS, 400X).



Resim 35. QCT2 grubuna ait ovaryum kesitinin IM görüntüsü. Bu görüntüde, sol taraftaki sekonder folikül (SF) ve multilaminar primer folikül (MPF)’de bütünlüğünü koruduğu görülmektedir. PAS (+) boyanma gösteren zona pellusida yapısı (bordo yıldız) ve bazal membran (turuncu ok) görülmektedir. Sağdaki SF’de zayıf PAS (+) boyanma gösteren zona pellusida yapısı (kırmızı yıldız) ve belirsiz haldeki bazal membran (turuncu ok) görülmektedir (PAS, 400X).

4.4. Biyokimyasal Bulgular

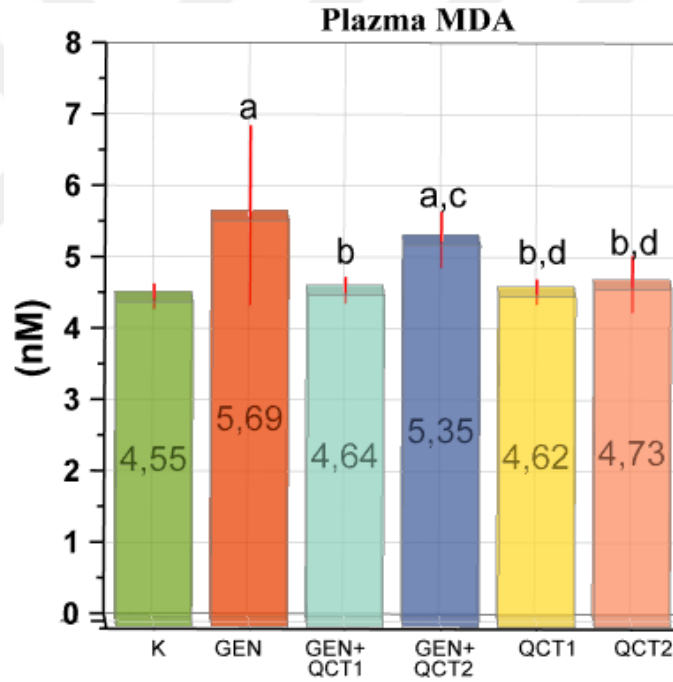
4.4.1. Plazma Biyokimyası

Grupların plazma MDA’sı değerlendirildiğinde GEN grubunda plazma MDA kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. GEN+QCT1 grubunda GEN grubuna göre anlamlı olarak azaldı. GEN+QCT2 grubunda kontrol ve GEN+QCT1 grubuna göre anlamlı olarak arttı. QCT1 ve QCT2 gruplarında GEN ve GEN+QCT2 grubuna göre anlamlı olarak azaldı (Tablo 13, Şekil 18).

Tablo 13. Plazma MDA istatistiksel verilerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Gruplar	Plazma MDA (nM)
K	4.55±0.18
GEN	5.69±1.26 ^a
GEN+QCT1	4.64±0.19 ^b
GEN+QCT2	5.35±0.40 ^{a, c}
QCT1	4.62±0.18 ^{b, d}
QCT2	4.73±0.40 ^{b, d}

Değerler ortalama±standart sapma (mean±SD) şeklinde verildi.
^a:K, ^b: GEN, ^c:GEN+QCT1, ^d:GEN+QCT2, ^e:QCT1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).



Şekil 18. Gruplara ait plazma MDA istatistik grafiği. Değerler ortalama±standart hata (mean±SE) şeklinde verildi. a:K, b: GEN, c:GEN+QCT1, d:GEN+QCT2, grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

4.4.2. Doku Biyokimyası

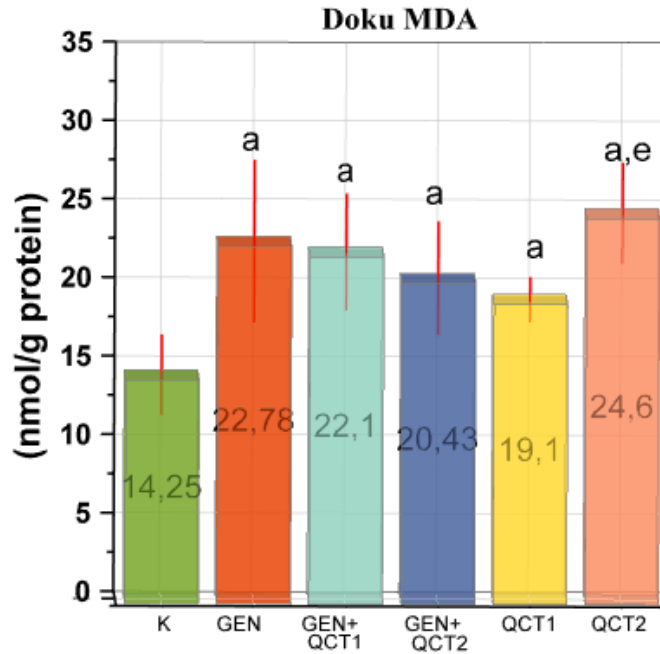
Çalışma sonunda gruplara ait ovaryum doku örneklerinde doku MDA, doku SOD, doku CAT ve doku GPx çalışıldı ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Doku MDA; GEN, GEN+QCT1, GEN+QCT2, QCT1 ve QCT2 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. QCT2 grubunda QCT1 grubuna göre anlamlı olarak arttı (Tablo 14, Şekil 19).

Tablo 14. Doku MDA istatistiksel verilerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Gruplar	Doku MDA (nmol/g protein)
K	14.25±2.58
GEN	22.78±5.18 ^a
GEN+QCT1	22.10±3.72 ^a
GEN+QCT2	20.43±3.64 ^a
QCT1	19.10±1.45 ^a
QCT2	24.60±3.23 ^{a,e}

Değerler ortalama±standart sapma (mean±SD) şeklinde verildi.
^a:K, ^b: GEN, ^c:GEN+QCT1, ^d:GEN+QCT2, ^e:QCT1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).



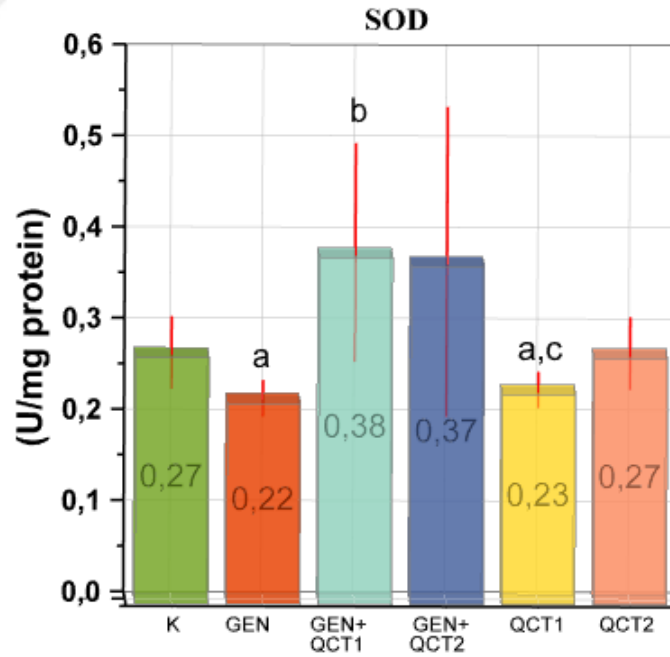
Şekil 19. Gruplara ait doku MDA istatistik grafiği. Değerler ortalama±standart hata (mean±SE) şeklinde verildi. a:K, e:QCT1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

Doku SOD aktivitesi; Gen ve QCT1 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı. GEN+QCT1 grubunda Gen grubuna göre anlamlı olarak arttı. QCT1 grubunda GEN+QCT1 grubuna göre anlamlı olarak azaldı (Tablo 15, Şekil 20).

Tablo 15. Doku SOD istatistiksel verilerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Gruplar	SOD (U/mg protein)
K	0.27±0.04
GEN	0.22±0.02 ^a
GEN+QCT1	0.38±0.12 ^b
GEN+QCT2	0.37±0.17
QCT1	0.23±0.02 ^{a,c}
QCT2	0.27±0.04

Değerler ortalama±standart sapma (mean±SD) şeklinde verildi.
^a:K, ^b: GEN, ^c:GEN+QCT1, ^d:GEN+QCT2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).



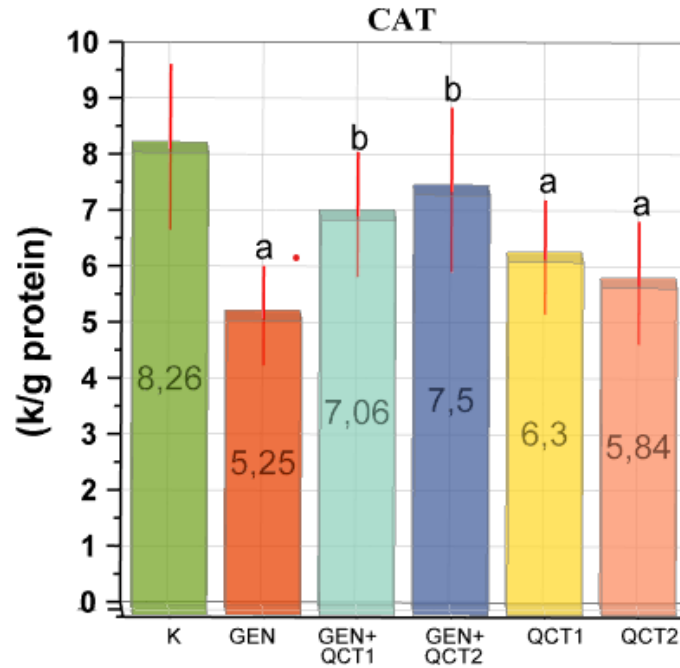
Şekil 20. Gruplara ait doku SOD istatistik grafiği. Değerler ortalama±standart sapma (mean±SD) şeklinde verildi. a:K, b: GEN, c:GEN+QCT1, grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

Doku katalaz aktivitesi, GEN grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azalış gösterdi. GEN+QCT1 ve GEN+QCT2 gruplarında CAT değeri GEN grubuna göre anlamlı bir artış gösterdi. QCT1 ve QCT2 gruplarında CAT aktivitesindeki azalış, GEN grubundaki kadar olmasa da kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalış göstermiştir (Tablo 16, Şekil 21).

Tablo 16. Doku CAT istatistiksel verilerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Gruplar	CAT (k/g protein)
K	8.26±1.48
GEN	5.25±0.89 ^a
GEN+QCT1	7.06±1.12 ^b
GEN+QCT2	7.50±1.47 ^b
QCT1	6.30±1.02 ^a
QCT2	5.84±1.10 ^a

Değerler ortalama±standart sapma (mean±SD) şeklinde verildi.
^a:K, ^b: GEN, ^c:GEN+QCT1, ^d:GEN+QCT2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).



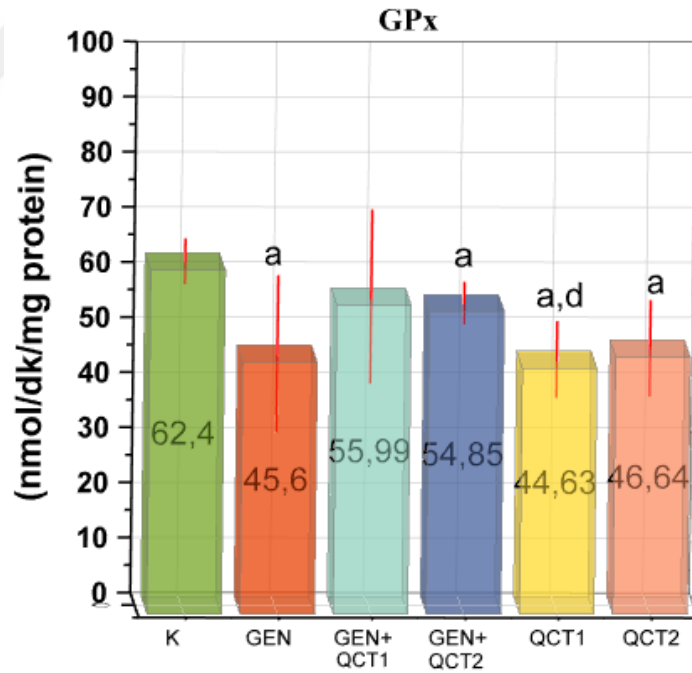
Şekil 21. Gruplara ait doku CAT istatistik grafiği. Değerler ortalama±standart sapma (mean±SD) şeklinde verildi. a:K, b:GEN, grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

Doku GPx aktivitesi GEN, GEN+QCT2, QCT1 ve QCT2 gruplarında kontrol gruplarına göre anlamlı olarak azaldı. QCT1 grubunda GEN+QCT2 grubuna göre anlamlı olarak azaldı (Tablo 17, Şekil 22).

Tablo 17. Doku GPx istatistiksel verilerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Gruplar	GPX (nmol/dk/mg protein)
K	62.40±4.16
GEN	45.60±14.29 ^a
GEN+QCT1	55.99±15.81
GEN+QCT2	54.85±3.87 ^a
QCT1	44.63±6.94 ^{a,d}
QCT2	46.64±8.77 ^a

Değerler ortalama±standart sapma (mean±SD) şeklinde verildi.
^a:K, ^d:GEN+QCT2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).



Şekil 22. Gruplara ait doku GPx istatistik grafiği. Değerler ortalama±standart sapma (mean±SD) şeklinde verildi. a:K, d:GEN+QCT2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

5.TARTIŞMA

Gentamisin başlıca böbrek olmak üzere çeşitli organlarda toksisite gösterebilen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Birçok bakteriyel enfeksiyonda kullanılmaktadır ve birçok yan etkiye sahiptir (174). Yapılan çalışmalarda gentamisinin, lizozomal membran geçirgenliğini arttırdığı, mitokondriyal fonksiyon kaybına sebep olduğu ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (175). Verdiği tüm bu hasarların temel sebeplerinden biri gentamisinin oksidatif stresi artırmasıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda üreme sağlığını etkileyecek hasarlara da sebebiyet verdiği gösterilmiştir (13, 176). Özellikle testis dokusu hasarı ve sperm parametrelerinde bozulmaya sebep olduğu görülmüştür (18, 177). Fakat ovaryum dokusuna verebileceği hasara dair herhangi bir *in vivo* deneysel çalışma olmadığı görülmüş ve literatüre katkı sağlamak adına bu çalışma tasarlanmıştır.

Kuersetin birçok sebze ve meyvede doğal olarak bulunan antioksidan potansiyeli yüksek bir flavonoiddir (176). Yüksek antioksidan kapasitesi birçok çalışmanın odağı haline gelmesinde büyük rol oynamıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda antikanserojen, antiviral, bakteriyostatik, antienflamatuar özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (139, 142, 178, 179). Kuersetinin, bakteriyostatik etkisinden yola çıkarak gentamisin gibi bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılan ajanlarla birlikte alımı sonucu tedaviyi destekleyici etki oluşturabilirken aynı zamanda antioksidan etkisi ile ROS hasarını azaltabilme potansiyeline sahip bir antioksidandır (19). Bizim çalışmamızın yoğunlaştığı konu, birlikte kullanım sonucu ROS değerlerindeki değişimi gözlemek ve histopatolojik olarak değerlendirmektir.

Ovaryum doku preparatlarında folikül sayımları sonucunda, GEN grubunda sekonder ve Graaf folikül sayılarında anlamlı bir azalış, atretik foliküllerde ise anlamlı bir artış görülmüştür. Sekonder ve Graaf foliküllerinin granüloza hücrelerinde dejenerasyonun artışı sonucu foliküllerin atreziye gitmesi ve bu durumun da atretik foliküllerde anlamlı bir artışa sebep olduğu düşünülebilir. GEN+QCT2, QCT1 ve QCT2 gruplarında sekonder ve Graaf foliküllerinde GEN grubuna göre anlamlı bir artış görülmektedir. Yapılan çalışmalar, PKOS oluşturulan sıçanlarda azalan sekonder ve Graaf folikül sayısının kuersetin tedavisi sonucu anlamlı derecede arttığı atretik folikül sayısının azaldığı, hormon seviyelerinin normalleştiği görülmüştür. Bunun yanında kuersetinin PKOS ile artan serum glikoz seviyelerinde düşüş sağladığı ve antioksidan enzim seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (180, 181).

Yapılan bir çalışmada QCT'nin granüloza hücrelerinde, antioksidan enzim ekspresyonunu düzenleyen sinyal yolu elemanlarından Nrf2'nin mRNA ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. Granüloza hücrelerinde artan Nrf2 ekspresyonunun aynı zamanda hücrelerde antioksidan aktiviteyi ve hücrelerin apoptoza gidişini kontrol eden tioredoksin (Trx) sistemini düzenlediği bunun da oksidatif strese karşı hücrel savunmayı arttırdığı gösterilmiştir (148, 182). Hücrel antioksidan enzimlerin azalması foliküler hücrelerde dejenerasyonu ve apoptoza gidişini artırır (183). Bizim çalışmamızda GEN hücrel ROS'u arttırarak antioksidan enzimlerin azalmasına sebep olmuştur. Bunun sonucunda granüloza hücrelerinde dejenerasyon meydana gelmiştir sonuç olarak hücrelerde apoptoz mekanizmasının indüklendiği düşünülmüştür. Adam Tarko ve ark. domuz granüloza hücrelerinde bir çevresel kirlenici olan benzen ile birlikte kuersetin dozlarını çalışmış, ovaryum hücrelerine etkilerini incelemiştir. Benzen (20 µg/ml) hücrelerde proliferasyonu ve apoptozu uyarıcı etki göstermiştir. Kuersetin (10, 100 µg/ml) tek başına uygulandığında proliferasyon ve apoptoz oranını düşürmüş oksitosin salınımını uyarmıştır (147). Dolayısıyla folikül hücrelerinin anormal artışının ve atreziye gidişinin önüne geçmiştir. QCT verilen grupların biyokimyasal sonuçlarında bazı antioksidan enzimlerinde azalma görülmesine rağmen sekonder ve Graaf foliküllerinin GEN grubuna göre sayısal olarak anlamlı fazlalığı ve atrezinin daha düşük olması, QCT'nin folikülleri apoptoza karşı korunmuş olabileceği varsayımını destekler niteliktedir.

Kuersetinin antioksidan özelliği birçok çalışma ile desteklenmiştir fakat sınırlı sayıdaki bazı çalışmalarda prooksidan özellik de sergilediği belgelenmiştir (184–186). QCT nin prooksidan özellik sergilemesinin sebepleri arasında kuersetinin ana oksidasyon ürünlerinden biri olan kuersetin-kinonun, protein yapısında yer alan tiyollerle kuvvetli reaksiyona girebilme potansiyeline sahip olması ve bunun sonucunda proteinlerin fonksiyon kaybına yol açması şeklinde sayılabilir. Antioksidanların görevi ortamdaki reaktif türlerle etkileşime girmek ve onları ortamdaki uzaklaştırmaktır. Fakat bu mekanizma tek bir antioksidanın gösterdiği bir etkinlik değildir. Birçok enzim ve protein etkileşimi sonucu meydana gelir. Kuersetinin ROS süpürücü etkinliğinde GSH aktivitesi önemli bir yer tutar. Bu durumun sonucu olarak ortamdaki antioksidan enzimlerin tüketimi artış gösterebilir. Yani QCT, ROS u temizleyici antioksidan etki gösterirken aynı zamanda toksisite oluşturma potansiyeline de sahip olabilmektedir (185). Bizim çalışmamızda kuersetinin iki farklı dozu

kullanılmış ve bu da yüksek doz ve düşük dozu birbirleri arasında karşılaştırma imkanı sunmuştur.

Doğal olarak vücutta üretilen antioksidan enzimler ve bunlara benzer işlev gören moleküller, ROS u etkisizleştirmede görevlidir. Vücudun ROS'a karşı savunmasında doğrudan etkili olan SOD, CAT, GPx doğal endojen antioksidanlardır. GPx hücrelerde doğal olarak bulunan ve GSH aktivitesi sonucu oluşan hücredeki peroksit bileşiklerini suya indirgeyen antioksidan enzimdir. GSH reaktif serbest radikallerini söndürücü proton desteğini sağlarken GPx lipit hidroperoksitleri indirgeme sürecini katalize eder. Bazı antioksidanlar enzimatik değildir. Bunlar metabolik antioksidanlar ve dışarıdan aldığımız besin kaynaklı antioksidanlardır. Dışarıdan takviye edilen antioksidanlar hücresel enzimlerin ROS'a karşı mücadelesini destekleyip oksidatif stres dengesinin sağlanmasında yardımcıdırlar. QCT de birçok çalışma ile güçlü antioksidan özellik gösterdiği belgelenen dışardan besinler yoluyla ya da saf formu ile alınabilen bir bileşiktir (187, 188).

Çalışma sonuçlarımıza bakıldığında kan plazmasında ve dokuda oksidatif stres belirleyici enzim değerleri ölçülmüş ve biyokimyasal testler sonucu anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

MDA, serbest radikallerin hücre zarındaki lipitlerle oluşturduğu reaksiyon sonucu oluşan lipit peroksidasyonunun zararlı yan ürünlerinden birisidir ve hücre zarlarındaki oksidatif hasar seviyesinin bir belirteçidir (189).

Plazma MDA'sı GEN grubunda anlamlı şekilde artış göstermiş, düşük doz kuersetin ile birlikte verilen grupta anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür. Bu sonuç QCT'nin GEN ile birlikte alımında antioksidan etkisini gösterdiğini doğrular bir sonuçtur. Fakat GEN+QCT2 grubunun plazma MDA değerleri incelendiğinde QCT nin antioksidan etkisinin GEN+QCT1'e göre anlamlı derecede azaldığı görülmektedir. Saf QCT dozları verilen gruplarda da yine kontrole göre plazma MDA değerlerinde anlamlı olmayan bir artış gözlenmiştir. Bu durum GEN'in plazmadaki oksidatif stresi arttırdığını ve makul dozlarda QCT ile birlikte kullanımının bu artışı düşürebileceği görüşünü destekler. Fakat QCT'nin tek başına kullanımı ya da tedavi grubunda yüksek dozlarda kullanımı plazma MDA düzeyinde olumsuz sonuçlar elde etmemize yol açmıştır.

Doku MDA sonuçlarına bakıldığında tüm grupların kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterdiği görülmüştür. QCT2 doku MDA'sını, QCT1'e göre anlamlı şekilde

artırmıştır. Yapılan bazı çalışmalar QCT'in zarlardaki çift tabakalı lipidlerin arasına kolayca girebildiği ve bu bölgelerde birikmesi ile zar geçirgenliğini arttırabileceğini göstermiştir (190, 191). Bu da yine antioksidan kapasitesinin doza bağlı olabileceği, yüksek dozlarda oksidatif stres değerlerini arttırıp prooksidan etki gösterebileceğini destekleyen bir sonuçtur.

SOD, hücrelerde oluşan süperoksit radikallerinin H_2O_2 ve dioksijene parçalanma reaksiyonunu katalizleyen endojen enzimlerdendir. Doku SOD değerlerinin istatistiksel sonuçlarına bakıldığında GEN grubunda anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür. GEN grubuna göre GEN+QCT1 grubunda anlamlı artış görülmüştür. Ancak QCT1 ve QCT2 gruplarında da kontrole göre anlamlı azalış görülmektedir.

GPx değerlerine bakıldığında GEN, GEN+QCT2, QCT1 ve QCT2 gruplarında kontrole göre anlamlı bir düşüş görülmüştür. GEN+QCT1 grubunda da anlamlı olmayan düşüş söz konusudur. Tedavi gruplarının GPx değerleri GEN grubuna göre anlamlı olmayan artış göstermiştir. Ancak saf kuersetin gruplarında dramatik bir düşüş söz konusudur.

Weina Gao ve ark. kuersetinin glutatyon homeostazını nasıl etkilediğine dair yaptıkları bir çalışmada, %0.5 QCT diyeti uygulanan sıçanların serum ve karaciğer dokusunda GSH değerlerinin düştüğünü, GSH metabolik enzimlerinin sentezinde sorumlu Keap1/Nrf2 protein ekspresyonlarının azaldığını ve GSH metabolizmasını düzenleyen MAPK sinyal yolunda değişiklikler meydana geldiğini belgelemişlerdir (192). Bin Meng ve ark. %1.0 metiyonin ve %0.5 QCT diyeti ile 6 hafta beslenen sıçanların saf metiyonin grubunda GSH değerleri artarken QCT verilen tüm gruplarda anlamlı seviyede düşüş kaydedilmiştir (193). Eun Jeong Choi ve ark. nın kuersetin ile yaptıkları 4 haftalık bir çalışmada, sıçanlara hergün oral gavaj ile 20 mg/kg QCT uygulanmış ve çalışmanın sonucunda karaciğer glutatyon (GSH) ve glutatyon redüktaz (GR) değerlerinde anlamlı derecede düşüş olduğu gözlenmiştir (186). Bu sonuçlar üzerine Eun Jeong Choi farklı bir çalışmada, 6 hafta süresince kuersetin ve daidzeini saf olarak ve kombine olarak uygulamıştır. 20 mg/kg QCT'nin tek başına verildiği grubun karaciğer dokusunda GSH ve GR seviyelerinin anlamlı şekilde azaldığı, 20 mg/kg daidzein ile birlikte verildiğinde bu değerlerde saf QCT grubuna göre anlamlı artış görüldüğü belgelenmiştir. Bu çalışmalarda kuersetinin yüksek dozlarda tek başına kullanımının GSH metabolizmasını olumsuz etkileyebildiği savunulmuştur (194). Marcela Bortoletto ve ark. sığır yumurtalık korteks dokusundan alınan örnekleri in vitro kültür ortamında 5 ve 10 gün süreyle kültürlemiş ve farklı konsantrasyonlarda kuersetin (10, 25 ve 50 $\mu\text{g/ml}$) ekleyerek ROS a karşı etkinliğini

ve folikül morfolojilerini koruyucu etkisi incelenmiştir. 25 µg/ml kuersetin konsantrasyonu en yüksek derecede morfolojik koruma ve antioksidan etki gösterirken yüksek doz kuersetinde bu etki gözlenememiştir (195). Bu sonuçlar çalışmamızda gözlemlediğimiz kuersetinin doza bağlı etkinlik gösterdiği görüşünü destekler niteliktedir.

CAT, hücredeki ROS'un temizlenme sürecinde oluşan H₂O₂'yi su ve moleküler oksijene parçalayan antioksidan enzimdir. CAT değerlerinde GEN, QCT1 ve QCT2 grupları kontrole göre anlamlı düşüş gösterirken tedavi gruplarında GEN grubuna göre anlamlı bir artış görülmektedir. Yüksek doz kuersetin tedavisindeki CAT artış oranı daha yüksektir.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, QCT dozunun hem tek başına uygulandığında hem de ilaç ile kombine tedavisinde yüksek dozlarda, ROS'u arttırıcı etki gösterebilirken düşük dozlarda ilaç kombine tedavide olumlu etkiler gösterebileceği düşünülebilir. Yapılan bazı çalışmalar metabolik aşamalarda semikinon ve kinon gibi oksidasyon ürünü oluşturan flavonoidlerin toksik etki gösterebileceğini çünkü oksitlenmiş bu ürünlerin redoks homeostazını etkileyip hücresel proteini tüketebileceği görüşünü desteklemektedir. Kuersetin de vücuttaki serbest radikallerle reaksiyona girer ve onları nötralize ederek radikallerin reaktivitesini kısmen devralmış olur. Özellikle QCT gibi katekol içeren antioksidanlar radikal süpürücü aktivitesi sırasında oksitlenmiş ürüne, yarı kinon radikaline dönüşürler. İkinci bir oksidasyon reaksiyonu sonucu dört tautomerik forma sahip kuersetin-kinona (QQ) dönüşürler (196).

Antioksidan aktivite sırasında oluşan bu oksitlenmiş ürünler hücre zarlarında ya da plazmada tiyollerle reaksiyona girme eğilimi gösterir. Bu ürünler ortamdaki GSH tarafından uzaklaştırılır. Fakat GSH'ın ortamda yeterli miktarda olmaması durumunda tiyol-QQ birlikteliği bazı enzimlerin bozulmasına yol açabilir (197). QCT'in bu özelliği bazı parametreler için yeterli antioksidan etkinlik gösterememesinin sebebini açıklayıcı niteliktedir. GEN'in GSH'ı düşürmesi QCT'in oksidasyon metabolitlerinin hücrelerde oluşturacağı hasara daha duyarlı hale gelmesine öncülük eder. Bu durum özellikle yüksek dozlarda QCT verilen tedavi gruplarında MDA, SOD ve GPx değerlerine bakıldığında yeterli antioksidan özellik gösterilememiş olmasının bir sebebi olarak düşünülebilir.

Flavia Cristina Vieira-Frez ve ark. yaptıkları çalışmada diyabetik ve normoglisemik sıçanlara iki ay boyunca, 10 mg/kg ve 100 mg/kg mikrokapsülasyon ile stabilize edilmiş kuersetin verilmiş; çalışma sonunda jejunum antioksidan kapasitesi ve oksidatif stres seviyeleri ölçülmüştür. Çalışma sonuçlarına bakıldığında yüksek doz QCT nin diyabetik

durumu daha da kötüleştirdiği, normoglisemik sıçanlarda da oksidatif stres seviyelerini arttırıp, pro-oksidatif etki gösterdiği görülmüştür. Düşük doz QCT diyabetik sıçanlarda antioksidan etki gösterip koruyuculuk sağlamıştır (198).

Agnieszka Robaszkiewicz ve ark. bir adenokarsinom hücre hattı olan A549 hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada kuersetinin düşük dozlarda (0.1-20 mM) hücre proliferasyonunu arttırıcı etkiler gösterirken dozu arttırıldıkça (50-200 mM) sitotoksik etki gösterdiğini yine yüksek kuersetin dozlarında SOD, CAT ve Glutasyon S-Transferaz (GST) antioksidan enzim seviyelerinin anlamlı oranda azaldığını belgelemiştir (199).

Yapılan bir çalışmada kuersetinin *in vivo* model organizmadaki toksik etkilerini değerlendirmek amacıyla farelere yüksek dozlarda (500, 1000, 1500, 2000 mg/kg) kuersetin i. p. yolla uygulanmış ve deney sonucunda karaciğer hasarını belirten hepatoksisite biyobelirteçlerinde artış olduğu görülmüştür. Yine aynı çalışmada oksidatif stres biyobelirteçleri ölçülmüş, karaciğer dokusundaki GSH değerinin düştüğü lipid peroksidasyon değerinin arttığı ve daha yüksek dozlarda SOD değerinde de anlamlı düşüş olduğu kaydedilmiştir (200).

Ranawat P. Ve ark. yaptıkları çalışmada yetişkin erkek farelere 2 hafta boyunca farklı dozlarda (2, 8 ve 20 mg/kg) QCT i.p. olarak uygulanmış ve testis histomorfolojisi, sperm hareketliliği, antioksidan enzim seviyeleri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, saf QCTnin doza bağlı olarak sperm sayı ve hareketliliğinde azalma, testis histomorfolojisinde bozulma, GSH seviyelerinde azalma, SOD, CAT aktivitelerinde düşüş ve lipid peroksidasyon seviyelerinde artış şeklinde görülmüştür (201). QCT fitoöstrojen grubuna dahil edilen flavonoidlerden biridir. Fitoöstrojenler, östrojen reseptör alt birimlerine bağlanarak östrojen agonisti ya da antagonisti olarak işlev görebilirler (202–204). Kolon kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada QCT'in doza bağlı şekilde, tip II estrojen bağlanma bölgesine yüksek afinite gösterdiği ve bu bağlanma ile hücre proliferasyonunu G0/G1 evresinde bloke edebildiği görülmüştür (205). Bir çalışmada QCT'in *in vitro* granüloza hücre kültürü modelinde, GH proliferasyonu, steroidogenezi ve ROS seviyeleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çıkan sonuçlar QCT'in doza bağlı olarak steroidojenik aktiviteyi değiştirebileceğini ve bunun sonucunda yumurtalık fonksiyonu etkileyebileceğini destekler niteliktedir (206). Bu çalışmaların sonuçları saf QCT'in doza bağlı olarak prooksidan etki gösterebileceğini doğrular niteliktedir.

Gentamisin vücutta serbest radikallerin ekspresyonunu arttırır ve bozulan antioksidan dengeden kaynaklanan hücresel DNA hasarı, protein ya da lipit metabolizmasındaki bozulma ile hücre dejenerasyonu ve artan apoptoz sonucu dokuda histopatolojik etkiler gösterir (207). Çalışmamızın histopatolojik değerlendirme sonuçlarına bakıldığında gentamisin grubunun tüm parametrelerde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği görülmüştür. Gentamisinin ovaryum dokusuna zarar verdiği hem histopatolojik sonuçlarla hem de biyokimyasal test sonuçları ile desteklenmiştir.

Gentamisin ovaryum dokusunda foliküler hücre dejenerasyonunu yüksek oranda arttırmıştır. Bunun yanında tedavi gruplarında bu artış kısmen azalmıştır. Saf kuersetin grubunda her iki dozda da aynı sonuçlar elde edilmiştir. Meryem Gencer ve ark. yaptığı bir çalışmada, ovaryum iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan Wistar sıçanlarına hasar oluşturmada önce 15 mg/kg kuersetin i.p. olarak enjekte edilmiş ve histopatolojik değerlendirmesi yapılmıştır. İşlem öncesi kuersetin enjekte edilen grubun; kanama, damar tıkanıklığı, ödem ve foliküler hücre dejenerasyonu açısından hasar grubuna kıyasla önemli ölçüde korunduğu görülmüştür (208).

Vasküler konjesyon oluşumu bakımından yapılan değerlendirmede GEN grubunda anlamlı seviyede artış görülmüştür. Düşük doz kuersetin grubunda kuersetinin bu hasarı önemli ölçüde azaltmadığı görülmüştür. Yüksek doz saf kuersetin grubunda vasküler konjesyonda anlamlı artış görülmüştür. QCT'in vazodilatasyon etkisi yapılan birçok çalışma ile belgelenmiştir. QCT, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimini aktive ederek nitrik oksit (NO) üretimini arttırıcı etki gösterebilir ayrıca hücre içi kalsiyum sinyallerini düzenleyerek yine NO sentezini uyarıcı etki gösterebilir bu da düz kas hücrelerinde gevsemeye ve vazodilatasyona yol açar. Bu durum QCT'in kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu, hipertansiyon riskini azaltıcı özelliğini vurgular (209). Çalışmamızda vasküler konjesyondaki artışın sebebi QCT'in damar genişlemesini kan akışını arttırıcı etkisinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Antioksidan takviyelerin yüksek dozlarda kullanımı sonucu hücrelerde oluşabilecek pro-oksidan etkinin ilk savunma sistemi tioredoksin ve glutatyon sistemleridir (210). Bu yüksek dozlar antioksidanların bitkilerden ve gıdalardan değil de doğrudan izole biçimde yüksek oranda tüketilmesi sonucu ortaya çıkabilen bir durumdur (211). Yüksek doz antioksidanlar oto-oksidasyon sonucu ROS üretimini arttırırken bunlara karşı savunma hattını oluşturan antioksidan enzimlerinde tükenmesine yol açar (212). Bunun yanında

birçok antioksidanın, hücresel antioksidan enzimlerin aşırı ekspresyonuna sebep olup ROS sinyal yolunu önemli oranda azaltabildiği; bozulan sinyal sistemi sonucunda enflamatuvar yanıtın oluşmasında ve hücresel redoks sisteminde kararsızlığa yol açabildiği görülmüştür (213). Bu durum reductive stres olarak adlandırılır ve hücresel redoks homeostazının bozulmasında oksidatif stres kadar etkili olabileceği görülmüştür (214). Reductive strese sebep olan durumlar arasında vitamin ve flavonoidlerin yüksek dozlarda uzun süreli tüketimi gösterilmektedir (215)

Germinal epitel dejenerasyonunda, GEN grubu başta olmak üzere tüm gruplarda anlamlı artış belirlenmiştir. Bu artış QCT1 ve QCT2 gruplarında GEN grubuna göre anlamlı olarak düşük çıksa da kontrole göre anlamlı bir artış bulunmuştur.

İnflamatuvar hücre yoğunluğuna bakıldığında QCT1 grubu hariç tüm gruplarda kontrole göre anlamlı bir artış olduğu görülmektedir. Düşük kuersetin tedavi grubunun GEN grubu ile istatistiksel sonuçlarının aynı olması bize düşük kuersetinin yeterli koruyuculuk sağlayamadığını göstermektedir. Yüksek kuersetin tedavi grubunda da inflamatuvar hücre oranında anlamlı bir azalış görülmemiştir. QCT2 grubu kontrole göre anlamlı artış göstermiştir. Bu sonuçlara bakıldığında özellikle yüksek saf QCT dozlarının dokuda inflamatuvar hücre artışına sebep olabildiği ancak GEN ile birlikte kullanımı sonucu hasarı azalttığı görülmektedir.

Dokudaki fibrozis oluşumu değerlendirildiğinde gentamisin kullanılan tüm grupların kontrole göre anlamlı artış gösterdiği ancak tedavi gruplarında bu artışın GEN grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı görülmektedir. Özellikle yüksek kuersetinli tedavi grubunda bu azalış daha fazladır. QCT'in dokuları fibroze karşı koruyucu etki gösterdiği birçok çalışma ile belgelenmiştir (216–218).

Tüm histopatolojik değerlendirme sonuçlarına bakıldığında yüksek doz kuersetinin çoğu histopatolojik parametrede, GEN'in arttırdığı hasarı azaltmakta etkili olabileceği görülürken; tek başına QCT kullanımında VK, GEH, İH parametrelerinde artışa sebep olduğu görülmüştür. Bu da yüksek doz QCT'in hücrelerdeki prooksidan etkisinin ovaryum histomorfolojisine de yansıdığını kanıtlamaktadır. Bu histopatolojik durumları destekleyen biyokimyasal sonuçlar elde edilmiştir. GEN verilen gruplarda ovaryum dokusunda artan MDA ve azalan SOD, CAT, GPx değerleri bize GEN'in ovaryumda hasara sebep olduğunu, QCT 'in bu hasarı azaltabileceğini; fakat bunun doza bağlı bir durum olup yüksek dozda ROS arttırıcı etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

6.SONUÇLAR ve ÖNERİLER

GEN kullanımının ovaryum dokusuna verebileceği hasarın ve QCT'in farklı dozlarının bu hasara karşı etkisini araştırdığımız bu çalışma sonucunda;

1. Vücut ağırlıklarında GEN, GEN+QCT1 gruplarında kontrole göre anlamlı düşüş görüldü. GEN+QCT2, QCT1 ve QCT2 gruplarında GEN grubuna göre anlamlı artış görüldü.
2. Over ağırlıklarında GEN+QCT1 ve QCT2 gruplarında kontrole oranla anlamlı düşüş görüldü. GEN+QCT1 ve GEN+QCT2 gruplarında over ağırlığı GEN grubuna göre azalmıştı. Ancak anlamlı değildi. QCT2 grubunda da GEN grubuna göre azalmıştı. Ancak anlamlı değildi.
3. GEN kullanımı sonucu sekonder ve Graaf foliküllerinde kontrol grubuna göre anlamlı azalış; atretik foliküllerde anlamlı artış görüldü. GEN+QCT1 grubunda atretik folikül GEN grubuna göre anlamlı olarak azaldı. QCT1 ve QCT2 gruplarında atretik foliküllerin, GEN grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü. GEN+QCT2 grubunda Graaf folikülü GEN grubuna göre anlamlı olarak arttı.
4. GEN ve GEN+QCT1 grubunda gentamisin kullanımı sonucu ovaryum dokusunda FHD, VK, GED, İH ve fibrozis kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı.
5. GEN+QCT1 ve GEN+QCT2 gruplarında fibrozis GEN grubuna göre anlamlı olarak azaldı.
6. GEN+QCT1 ve QCT2 gruplarında VK kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı.
7. QCT1 grubunda GED, İH ve fibrozis GEN grubuna göre anlamlı olarak azaldı.
8. GEN+QCT1 grubunda FHD, VK, GED, İH kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı.
9. GEN+QCT2 grubunda FHD, VK, GED, İH ve fibrozis kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Fibrozis GEN grubuna göre anlamlı olarak azaldı.
10. GEN grubunun biyokimyasal test sonuçlarında plazma MDA'nın GEN ve GEN+QCT2 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, GEN+QCT1 ve QCT1 ve QCT2 gruplarında GEN grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü.
11. Doku MDA'nın tüm gruplarda kontrol grubuna göre ve QCT2 grubunda QCT1 grubuna göre anlamlı olarak arttığı görüldü.
12. Doku SOD seviyesi GEN grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı. GEN+QCT1 grubunda GEN grubuna göre anlamlı olarak arttı.

13. Doku GPx değeri, GEN, GEN+QCT2, QCT1 ve QCT2 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı. QCT1 grubunda GEN+QCT2 grubuna göre anlamlı olarak azdı. GEN+QCT2 grubunda GEN+QCT1 grubuna göre azalmıştı. Ancak anlamlı değildi.
14. Doku CAT değeri, GEN ve QCT1 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı. GEN+QCT1 ve GEN+QCT2 gruplarında GEN grubuna göre anlamlı olarak artmıştı. GEN+QCT1 grubunda GEN+QCT2 grubuna göre azdı. Ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. QCT2 grubunda QCT1 grubuna göre azalmıştı. Ancak anlamlı değildi.

Yaptığımız çalışma ile GEN'in ovaryum dokusuna hem biyokimyasal parametreler bakımından hem de histopatolojik olarak hasar verebildiği sonucuna ulaştık. QCT nin doza bağımlı olarak bu hasarı azaltabildiği ancak tek başına kullanımında prooksidan etkiler de gösterebileceği sonucuna vardık.

İlerideki çalışmalar için öneriler:

- QCT ile yapılan çalışmalarda endojen enzimlerin ekspresyonunu düzenleyen Keap1/Nfr2/ARE sinyal yoluna ait protein düzeylerinin de ölçülmesi, QCTnin hücresel antioksidan savunmasına nasıl bir katkıda bulunduğu dair daha ayrıntılı fikir verebilir.
- TUNEL boyama gibi immünohistokimyasal boyama yöntemleri kullanılarak apoptotik hücre seviyeleri ölçülebilir.
- QCT'in hücrelerdeki moleküler etkileşim ağının daha kapsamlı bir araştırması yapılabilir.
- QCT'in fitoöstrojen sınıfında yer alması dolayısıyla hormonal aktivitesi yüksek organlarla çalışılacak ise çalışma süresince hormon düzeylerinin de takibi yapılabilir.
- Çalışmanın istatistiksel olarak daha güvenilir sonuçlar verebilmesi için deney gruplarına ait hayvan sayıları artırılabilir.
- Kullanılan antioksidan maddenin etkilerinin daha iyi belirleyebilmek için deney süresi uzatılabilir.
- Antioksidan maddenin doz çeşitliliği artırılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Farquhar CM, Bhattacharya S, Repping S, Mastenbroek S, Kamath MS, Marjoribanks J, Boivin J (2019). Female subfertility. *Nature Reviews Disease Primers* 2018 5:1 5: 1–21.
2. Vander Borgh M, Wyns C (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry* 62: 2–10.
3. Ravel J, Moreno I, Simón C (2021). Bacterial vaginosis and its association with infertility, endometritis, and pelvic inflammatory disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 224: 251–257.
4. Smolarczyk K, Mlynarczyk-bonikowska B, Rudnicka E, Szukiewicz D, Meczekalski B, Smolarczyk R, Pieta W (2021). The impact of selected bacterial sexually transmitted diseases on pregnancy and female fertility. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 2170 22: 2170.
5. Ombelet W, Cooke I, Dyer S, Serour G, Devroey P (2008). Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Human Reproduction Update* 14: 605–621.
6. Sojo-Dorado J, Rodríguez-Baño J (2023). Gentamicin. *Kucers the use of antibiotics: a clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic, and antiviral drugs. Seventh edition* 964–991. doi:10.1201/9781315152110.
7. Gyselynck AM, Forrey A, Cutler R (1971). Pharmacokinetics of gentamicin: distribution and plasma and renal clearance. *The Journal of Infectious Diseases* 124: S70–S76.
8. Hayward RS, Harding J, Molloy R, Land L, Longcroft-Neal K, Moore D, Ross JDC (2018). Adverse effects of a single dose of gentamicin in adults: a systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology* 84: 223.
9. Musiime GM, Seale AC, Moxon SG, Lawn JE (2015). Risk of gentamicin toxicity in neonates treated for possible severe bacterial infection in low- and middle-income countries: Systematic Review. *Tropical Medicine & International Health* 20: 1593–1606.
10. Horvath G, Reglodi D, Czetany P, Illes A, Reman G, Fekete A, Toth G, Laszlo E,

- Opper B (2019). Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human proximal tubule cells against gentamicin toxicity. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 25: 257–264.
11. Noack V, Pak K, Jalota R, Kurabi A, Ryan AF (2017). An antioxidant screen identifies candidates for protection of cochlear hair cells from gentamicin toxicity. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11.
 12. Aly HAA (2019). Testicular toxicity of gentamicin in adult rats: Ameliorative effect of lycopene. *Human and Experimental Toxicology* 38: 1302–1313.
 13. Aly HAA, Hassan MH (2018). Potential testicular toxicity of gentamicin in adult rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 497: 362–367.
 14. Kim SH, Lee IC, Baek HS, Shin IS, Moon C, Kim SH, Yun WK, Nam KH, Kim HC, Kim JC (2014). Melatonin prevents gentamicin-induced testicular toxicity and oxidative stress in rats. *Andrologia* 46: 1032–1040.
 15. O'Reilly M, Young L, Kirkwood NK, Richardson GP, Kros CJ, Moore AL (2019). Gentamicin affects the bioenergetics of isolated mitochondria and collapses the mitochondrial membrane potential in cochlear sensory hair cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13: 479721.
 16. Perkins AT, Das TM, Panzera LC, Bickel SE (2016). Oxidative stress in oocytes during midprophase induces premature loss of cohesion and chromosome segregation errors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: E6823–E6830.
 17. Adeoye O, Olawumi J, Opeyemi A, Christiania O (2018). Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assisted Reproduction* 22: 61.
 18. Zahedi A, Fathiazad F, Khaki A, Ahmadnejad B (2012). Protective effect of ginger on gentamicin-induced apoptosis in testis of rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2: 197.
 19. Bustos PS, Deza-Ponzio R, Páez PL, Albesa I, Cabrera JL, Virgolini MB, Ortega MG (2016). Protective effect of quercetin in gentamicin-induced oxidative stress in vitro and in vivo in blood cells. Effect on gentamicin antimicrobial activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 48: 253–264.

20. Piomboni P, Travagli V, Tricarico G, Dutta S, Sengupta P, Roychoudhury S, Chakravarthi S, Woon Wang C, Slama P (2022). Antioxidant paradox in male infertility: “a blind eye” on Inflammation. doi:10.3390/antiox11010167.
21. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* 585: 325–337.
22. Yang T, Kong B, Gu JW, Kuang YQ, Cheng L, Yang WT, Xia X, Shu HF (2014). Anti-apoptotic and anti-oxidative roles of quercetin after traumatic brain injury. *Cellular and Molecular Neurobiology* 34: 797–804.
23. Rogerio AP, Kanashiro A, Fontanari C, Da Silva EVG, Lucisano-Valim YM, Soares EG, Faccioli LH (2007). Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation Research* 56: 402–408.
24. Lamson DW, Brignall MS (2000). Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Alternative Medicine Review : a Journal of Clinical Therapeutic* 5: 196–208.
25. Zhang H, Zhang M, Yu L, Zhao Y, He N, Yang X (2012). Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology* 50: 1589–1599.
26. Sharmila G, Bhat FA, Arunkumar R, Elumalai P, Raja Singh P, Senthilkumar K, Arunakaran J (2014). Chemopreventive effect of quercetin, a natural dietary flavonoid on prostate cancer in in vivo model. *Clinical Nutrition* 33: 718–726.
27. Shafabakhsh R, Asemi Z (2019). Quercetin: a natural compound for ovarian cancer treatment. *Journal of Ovarian Research* 12.
28. Kuo PC, Liu HF, Chao JI (2004). Survivin and p53 Modulate Quercetin-induced cell growth inhibition and apoptosis in human lung carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 279: 55875–55885.
29. Naseer Z, Ahmad E, Epikmen ET, Uçan U, Boyacıoğlu M, İpek E, Akosy M (2017). Quercetin supplemented diet improves follicular development, oocyte quality, and reduces ovarian apoptosis in rabbits during summer heat stress. *Theriogenology* 96: 136–141.
30. Auersperg N, Wong AST, Choi K-C, Kang SK, Leung PCK (2001). Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine Reviews* 22: 255–288.

31. Williams CJ, Erickson GF (2012). Morphology and physiology of the ovary. Endotext.
32. Yin Y, Ma L (2005). Development of the mammalian female reproductive tract. *The Journal of Biochemistry* 137: 677–683.
33. McLaren A (2000). Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Molecular and Cellular Endocrinology* 163: 3–9.
34. Berta P, Hawkins JB, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 1990 348:6300 348: 448–450.
35. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews* 87: 1–28.
36. Stévant I, Nef S (2019). Genetic control of gonadal sex determination and development. *Trends in Genetics* 35: 346–358.
37. Pannetier M, Chassot AA, Chaboissier MC, Pailhoux E (2016). Involvement of FOXL2 and RSPO1 in ovarian determination, development, and maintenance in mammals. *Sexual Development* 10: 167–184.
38. Kobayashi A, Behringer RR (2003). Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature Reviews Genetics* 2003 4:12 4: 969–980.
39. Jameson JL, Achermann JC, Ozisik G, Meeks JJ (2003). Battle of the sexes: new insights into genetic pathways of gonadal development. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 114: 51.
40. Ozisik G, Achermann JC, Jameson JL (2002). The role of SF1 in adrenal and reproductive function: insight from naturally occurring mutations in humans. *Molecular Genetics and Metabolism* 76: 85–91.
41. Birk OS, Caslano DE, Wassif CA, Cogilatl T, Zhaos L, Zhao Y, Grinberg A, Huang SP, Kreidberg JA, Parker KL, et al. (2000). The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature* 2000 403:6772 403: 909–913.
42. Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S (1997). Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* 124: 1653–1664.

43. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74: 679–691.
44. Pitzer LM, Moroney MR, Nokoff NJ, Sikora MJ (2021). WNT4 balances development vs disease in gynecologic tissues and women's health. *Endocrinology* 162: 1–12.
45. Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ (2004). A WNT4 mutation associated with müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040533> 351: 792–798.
46. Chawengsaksophak K, Svingen T, Ng ET, Epp T, Spiller CM, Clark C, Cooper H, Koopman P (2012). Loss of Wnt5a disrupts primordial germ cell migration and male sexual development in mice. *Biology of Reproduction* 86: 1–12.
47. Lessey BA, Young SL (2019). Structure, function, and evaluation of the female reproductive tract. Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management: Eighth edition 206-247.e13. doi:10.1016/B978-0-323-47912-7.00009-3.
48. Kemp C, Willems E, Abdo S, Lambiv L, Leyns L (2005). Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development. *Developmental Dynamics* 233: 1064–1075.
49. Tres LL, Rosselot C, Kierszenbaum AL (2004). Primordial germ cells: what does it take to be alive? *Molecular Reproduction and Development* 68: 1–4.
50. Kobayashi A, Behringer RR (2003). Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature Reviews Genetics* 2003 4:12 4: 969–980.
51. Pereda J, Zorn T, Soto-Suazo M (2006). Migration of human and mouse primordial germ cells and colonization of the developing ovary: An ultrastructural and cytochemical study. *Microscopy Research and Technique* 69: 386–395.
52. Fujimoto T, Miyayama Y, Fuyuta M (1977). The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *The Anatomical Record* 188: 315–329.
53. Beddington RSP, Robertson EJ (1998). Anterior patterning in mouse. *Trends in Genetics* 14: 277–284.

54. Nilsson EE, Skinner MK (2003). Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biology of Reproduction* 69: 1265–1272.
55. Møllgård K, Jespersen A, Lutterodt MC, Yding Andersen C, Høyer PE, Byskov AG (2010). Human primordial germ cells migrate along nerve fibers and Schwann cells from the dorsal hind gut mesentery to the gonadal ridge. *Molecular Human Reproduction* 16: 621–631.
56. Wu CY, Wu J Der, Chen CC (2021). The association of ovarian teratoma and anti-n-methyl-d-aspartate receptor encephalitis: An updated integrative review. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 10911.
57. Gruenwald P (1942). The development of the sex cords in the gonads of man and mammals. *American Journal of Anatomy* 70: 359–397.
58. Moore KL. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 10th edition. Elsevier, Philadelphia; 2016. 260-281.
59. Oktem O, Oktay K (2008). The ovary: Anatomy and function throughout human life. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1127: 1–9.
60. Mescher Anthony L. (2016). *Junqueira's basic histology, text and atlas*. Junqueira temel histoloji atlas kitap. 13 th ed. Çeviren: Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Sti., İstanbul, Sayfa: 449-478.
61. Vaskivuo TE, Anttonen M, Herva R, Billig H, Dorland M, Te Velde ER, Stenbačck F, Stenbačck S, Heikinheimo M, Tapanainen JS (2001). Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86: 3421–3429.
62. Channing CP, Hillensjo T, Schaerf FW (1978). Hormonal control of oocyte meiosis, ovulation and luteinization in mammals. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 7: 601–624.
63. Roly ZY, Backhouse B, Cutting A, Tan TY, Sinclair AH, Ayers KL, Major AT, Smith CA (2018). The cell biology and molecular genetics of müllerian duct development. *wiley interdisciplinary reviews: Developmental Biology* 7: e310.

64. Haqq CM, King CY, Ukiyama E, Falsafi S, Haqq TN, Donahoe PK, Weiss MA (1994). Molecular basis of mammalian sexual determination: Activation of Müllerian inhibiting substance gene expression by SRY. *Science* 266: 1494–1500.
65. Pask A (2016). The reproductive system. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 886: 1–12.
66. Sajjad Y (2010). Development of the genital ducts and external genitalia in the early human embryo. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 36: 929–937.
67. Witschi E (1959). Embryology of the uterus: normal and experimental. *Annals of the New York Academy of Sciences* 75: 412–435.
68. Puppo V (2011). Embryology and anatomy of the vulva: The female orgasm and women's sexual health. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 154: 3–8.
69. Healey A (2010). Embryology of the female reproductive tract 21–30. doi:10.1007/174_2010_128.
70. Rendi MH, Muehlenbachs A, Garcia RL, Boyd KL (2012). Female reproductive system. *Comparative Anatomy and Histology* 253–284. doi:10.1016/B978-0-12-381361-9.00017-2.
71. Colvin CW, Abdullatif H (2013). Anatomy of female puberty: The clinical relevance of developmental changes in the reproductive system. *Clinical Anatomy* 26: 115–129.
72. Blaustein A (1982). Anatomy and histology of the human ovary. *Pathology of the Female Genital Tract* 416–441. doi:10.1007/978-1-4757-1767-9_16.
73. Hossain MI, O'Shea JD (1983). The vascular anatomy of the ovary and the relative contribution of the ovarian and uterine arteries to the blood supply of the ovary in the guinea-pig. *Journal of Anatomy* 137: 457.
74. Picut CA, Remick AK, Asakawa MG, Simons ML, Parker GA (2014). Histologic features of prepubertal and pubertal reproductive development in female sprague-dawley rats. *Toxicologic Pathology* 42: 403–413.
75. Reynaud K, Driancourt MA (2002). Particularités du follicule et de l'ovocyte prépubères. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 30: 814–816.

76. Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, Jones PBC (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrine Reviews* 5: 76–127.
77. Keyes PL, Wiltbank MC (2003). Endocrine regulation of the corpus luteum. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph50030188002341> 50: 465–482.
78. Orsi NM, Baskind NE, Cummings M (2014). Anatomy, development, histology, and normal function of the ovary. *Pathology of the Ovary, Fallopian Tube and Peritoneum* 1–32. doi:10.1007/978-1-4471-2942-4_1/cover.
79. Fauser BCJM, van Heusden AM (1997). Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocrine Reviews* 18: 71–106.
80. AlAsiri SA, Ghahremani M, McComb PF (2012). Cornual polyps of the fallopian tube are associated with endometriosis and anovulation. *Obstetrics and Gynecology International* 2012: 1–5.
81. Eddy CA (1981). Tubal physiology and microsurgery. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 21: 129–133.
82. Doyle LL, Lippes J, Winters HS, Margolis AJ (1966). Human ova in the Fallopian tube. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 95: 115–117.
83. Bridges NA, Cooke A, Healy MJR, Hindmarsh PC, Brook CGD (1996). Growth of the uterus. *Archives of Disease in Childhood* 75: 330.
84. Graziottin A, Gambini D (2015). Anatomy and physiology of genital organs – women. *Handbook of Clinical Neurology* 130: 39–60.
85. Ross MH PW (2018). Pawlina, W., & Ross, M. H. (2018). *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Lippincott Williams & Wilkins.
86. Feng Y, Tamadon A, Hsueh AJW (2018). Imaging the ovary. *Reproductive BioMedicine Online* 36: 584–593.
87. Maggi R, Cariboni AM, Marelli MM, Moretti RM, André V, Marzagalli M, Limonta P (2016). GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. *Human reproduction update* 22: 358–381.
88. Lunenfeld B, Insler V (1993). Follicular development and its control. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological*

Endocrinology 7: 285–291.

89. Hirshfield AN (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology* 124: 43–101.
90. Bleil JD, Wassarman PM (1980). Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Developmental Biology* 76: 185–202.
91. Fortune JE (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science* 78: 135–163.
92. Vanderhyden BC, Macdonald EA (1998). Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis throughout follicular development. *Biology of Reproduction* 59: 1296–1301.
93. McGee EA, Perlas E, LaPolt PS, Tsafiri A, Hsueh AJW (1997). Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biology of reproduction* 57: 990–998.
94. Oktay K, Briggs D, Gosden RG (1997). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82: 3748–3751.
95. Henkes LE, Davis JS, Rueda BR (2003). Mutant mouse models and their contribution to our knowledge of corpus luteum development, function and regression. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 1–9.
96. Lyons RA, Saridogan E, Djahanbakhch O (2006). The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Human Reproduction Update* 12: 363–372.
97. Jansen RPS (1980). Cyclic changes in the human fallopian tube isthmus and their functional importance. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 136: 292–308.
98. Barton BE, Herrera GG, Ananthakumara P, Rock JK, Willie AM, Harris EA, Takemaru KI, Winuthayanon W (2020). Roles of steroid hormones in oviductal function. *Reproduction (Cambridge, England)* 159: R125.

99. Adhikari D, Liu K (2009). Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews* 30: 438–464.
100. Avella MA, Baibakov B, Dean J (2014). A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *Journal of Cell Biology* 205: 801–809.
101. Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, Biswal BK, Palaniappan C, Malhotra SS, Gupta N (2012). Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell and Tissue Research* 349:3 349: 665–678.
102. Magoffin DA (2005). Ovarian theca cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 1344–1349.
103. Eroschenko VP (2008). Female reproductive system. Di Fiore's atlas of histology with functional correlations, 11, 439-88. (C. Taylor, editor).
104. Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Cook RW, Kipp JL, Shea LD, Mayo KE, Woodruff TK (2006). Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Developmental biology* 298: 132–148.
105. Tilly JL (2001). Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nature reviews Molecular cell biology* 2: 838–848.
106. Zhou J, Peng X, Mei S (2019). Autophagy in ovarian follicular development and atresia. *International Journal of Biological Sciences* 15: 726–737.
107. Siber GR, Echeverria P, Smith AL, Paisley JW, Smith DH (2012). Pharmacokinetics of gentamicin in children and adults. *Journal of Investigative Dermatology* 132: 637–651.
108. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130: 797–810.
109. Li L, Liang F, Li C, Hou T, Xu DA (2022). Antibacterial Mechanism of Chitosan-Gentamicin and Its Effect on the Intestinal Flora of *Litopenaeus vannamei* Infected with *Vibrio parahaemolyticus*. *Marine drugs* 20: 702.
110. Hathorn E, Dhasmana D, Duley L, Ross JDC (2014). The effectiveness of gentamicin in the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*: a systematic review. *Systematic Reviews*

3: 104.

111. Aly HAA (2019). Testicular toxicity of gentamicin in adult rats: Ameliorative effect of lycopene. *Human and Experimental Toxicology* 38: 1302–1313.
112. Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan AU (2008). Aminoglycosides versus bacteria--a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *Journal of biomedical science* 15: 5–14.
113. Kandeel M, Abdelaziz I, Elhabashy N, Hegazy H, Tolba Y (2011). Nephrotoxicity and oxidative stress of single large dose or two divided doses of gentamicin in rats. *Pakistan journal of biological sciences : PJBS* 14: 627–633.
114. Kahlmeter G, Dahlager JI (1984). Aminoglycoside toxicity - a review of clinical studies published between 1975 and 1982. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 13 Suppl A: 9–22.
115. Narayana K (2008). An aminoglycoside antibiotic gentamycin induces oxidative stress, reduces antioxidant reserve and impairs spermatogenesis in rats. *The Journal of Toxicological Sciences* 33: 85–96.
116. Sies H (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology* 4: 180.
117. Pisoschi AM, Pop A (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97: 55–74.
118. Di Meo S, Venditti P (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020.
119. Wang L, Tang J, Wang L, Tan F, Song H, Zhou J, Li F (2021). Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction. *Journal of Cellular Physiology* 236: 7966–7983.
120. Yan F, Zhao Q, Li Y, Zheng Z, Kong X, Shu C, Liu Y, Shi Y (2022). The role of oxidative stress in ovarian aging: a review. *Journal of Ovarian Research* 2022 15:1 15: 1–20.
121. Lakhanpal P, Rai DK (2007). Quercetin: a versatile flavonoid. *internet journal of medical update - Ejournal* 2.

122. Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM, Lines TC (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology* 45: 2179–2205.
123. Scholz S, Williamson G (2013). Interactions Affecting the Bioavailability of Dietary Polyphenols *in Vivo*. <https://doi.org/10.1024/0300-9831773224> 77: 224–235.
124. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 5280343. Available from: <http://pubchem.ncbi.gov/compound/Quercetin>. [Accessed 9 August 2023].
125. Kashyap D, Garg VK, Tuli HS, Yerer MB, Sak K, Sharma AK, Kumar M, Aggarwal V, Sandhu SS (2019). Fisetin and quercetin: promising flavonoids with chemopreventive potential. *Biomolecules* 9.
126. Bhagwat S, Haytowitz DB, Holden JM (2013). USDA Database for the flavonoid content of selected foods release 3.1.
127. Guo Y, Bruno RS (2015). Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 26: 201–210.
128. Hubbard GP, Wolfram S, Lovegrove JA, Gibbins JM (2004). Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2: 2138–2145.
129. Hollman PCH, De Vries JHM, Van Leeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition* 62: 1276–1282.
130. Morand C, Manach C, Crespy V, Remesy C (2000). Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model. *BioFactors* 12: 169–174.
131. Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H, Veit M (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *Journal of clinical pharmacology* 41: 492–499.
132. Day AJ, Dupont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ c., Morgan MR a., Williamson G (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small

- intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Letters* 436: 71–75.
133. Murota K, Terao J (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 417: 12–17.
 134. Day AJ, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, Williamson G (2003). Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical Pharmacology* 65: 1199–1206.
 135. Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Davis B (2009). Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 296.
 136. Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 16: 845–850.
 137. Mariani C, Braca A, Vitalini S, De Tommasi N, Visioli F, Fico G (2008). Flavonoid characterization and in vitro antioxidant activity of *Aconitum anthora* L. (Ranunculaceae). *Phytochemistry* 69: 1220–1226.
 138. De Marchi U, Biasutto L, Garbisa S, Toninello A, Zoratti M (2009). Quercetin can act either as an inhibitor or an inducer of the mitochondrial permeability transition pore: A demonstration of the ambivalent redox character of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787: 1425–1432.
 139. Cossarizza A, Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, De Biasi S, Roat E, Bertoncelli L, Cooper EL (2011). Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2011.
 140. Boesch-Saadatmandi C, Loboda A, Wagner AE, Stachurska A, Jozkowicz A, Dulak J, Döring F, Wolffram S, Rimbach G (2011). Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. *The Journal of nutritional biochemistry* 22: 293–299.
 141. Lotito SB, Frei B (2006). Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor α -induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *Journal of*

Biological Chemistry 281: 37102–37110.

142. Wang S, Yao J, Zhou B, Yang J, Chaudry MT, Wang M, Xiao F, Li Y, Yin W (2018). Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro. *Journal of food protection* 81: 68–78.
143. Ho CL, Kao NJ, Lin CI, Cross TWL, Lin SH (2022). Quercetin increases mitochondrial biogenesis and reduces free radicals in neuronal SH-SY5Y cells. *Nutrients* 2022, Vol 14, Page 3310 14: 3310.
144. Utesch D, Feige K, Dasenbrock J, Broschard TH, Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Lines TC (2008). Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 654: 38–44.
145. Gao L, Schäfer C, O'Reardon K, Gorgus E, Schulte-Hubbert R, Schrenk D (2021). The mutagenic potency of onion juice vs. its contents of quercetin and rutin. *Food and Chemical Toxicology* 148: 111923.
146. Aravindakshan M, Chauhan PS, Sundaram K (1985). Studies on germinal effects of quercetin, a naturally occurring flavonoid. *Mutation Research Letters* 144: 99–106.
147. Tarko A, Štochmal'Ová A, Jedličková K, Hrabovszká S, Vachanová A, Halim Harrath A, Alwasel S, Alrezaki A, Kotwica J, Baláai A, et al. (2019). Effects of benzene, quercetin, and their combination on porcine ovarian cell proliferation, apoptosis, and hormone release. *Archives Animal Breeding* 62: 345.
148. Rashidi Z, Aleyasin A, Eslami M, Nekoonam S, Zendedel A, Bahramrezaie M, Amidi F (2019). Quercetin protects human granulosa cells against oxidative stress via thioredoxin system. *Reproductive Biology* 19: 245–254.
149. Teekaraman D, Elayapillai SP, Viswanathan MP, Jagadeesan A (2019). Quercetin inhibits human metastatic ovarian cancer cell growth and modulates components of the intrinsic apoptotic pathway in PA-1 cell line. *Chemico-Biological Interactions* 300: 91–100.
150. Scambia G, Ranelletti FO, Benedetti Panici P, Bonanno G, De Vincenzo R, Piantelli M, Mancuso S (1990). Synergistic antiproliferative activity of quercetin and cisplatin on ovarian cancer cell growth. *Anti-cancer drugs* 1: 45–48.
151. Liu Y, Gong W, Yang ZY, Zhou XS, Gong C, Zhang TR, Wei X, Ma D, Ye F, Gao

- QL (2017). Quercetin induces protective autophagy and apoptosis through ER stress via the p-STAT3/Bcl-2 axis in ovarian cancer. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 22: 544–557.
152. Abarikwu SO, Simple G, Onuoha CS (2020). Morphometric evaluation of the seminiferous tubules and the antioxidant protective effects of gallic acid and quercetin in the testis and liver of butyl phthalate treated rats. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* 35: 20–31.
 153. Saber TM, Abd El-Aziz RM, Ali HA (2016). Quercetin mitigates fenitrothion-induced testicular toxicity in rats. *Andrologia* 48: 491–500.
 154. Wattanathorn J, Sriraksa N, Muchimapura S, Tiamkao S, Brown K, Chaisiwamongkol K (2012). Cognitive-enhancing effect of quercetin in a rat model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2012.
 155. Liu H, Zhang L, Lu S (2012). Evaluation of antioxidant and immunity activities of quercetin in isoproterenol-Treated Rats. *Molecules* 17: 4281.
 156. D'Andrea G (2015). Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* 106: 256–271.
 157. Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS letters* 416: 123–129.
 158. Sahu RK, Basu R, Sharma A (1981). Genetic toxicological testing of some plant flavonoids by the micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 89: 69–74.
 159. Vanhees K, Bock L De, Godschalk RWL, Van Schooten FJ, Barjesteh Van Waalwijk Van Doorn-Khosrovani S (2011). Prenatal exposure to flavonoids: implication for cancer risk. *Toxicological Sciences* 120: 59–67.
 160. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox*

Signaling 18: 1818–1892.

161. Shu, X., Hu, X. J., Zhou, S. Y., Xu, C. L., Qiu, Q. Q., Nie, S. P., & Xie, M. Y. (2011). Effect of quercetin exposure during the prepubertal period on ovarian development and reproductive endocrinology of mice. *Yao xue xue bao = Acta Pharmaceutica Sinica*, 46(9), 1051-1057
162. Abdel-Raheem IT, Abdel-Ghany AA, Mohamed GA (2009). Protective effect of quercetin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 32: 61–67.
163. Fischer C, Speth V, Fleig-Eberenz S, Neuhaus G (1997). Induction of zygotic polyembryos in wheat: influence of auxin polar transport. *The Plant cell* 9: 1767–1780.
164. Ross MH PW (2011). Ross MH, Pawlina W. 2011. *Histology: a text and atlas, with correlated cell and molecular biology*. 6th ed. Philadelphia (PA): Wolters Kluwer Health., Wolters KL.
165. Roshangar L, Hamdi BA, Khaki AA, Rad JS, Soleimani-Rad S (2014). Effect of low-frequency electromagnetic field exposure on oocyte differentiation and follicular development. *Advanced Biomedical Research* 3: 76.
166. Standring S. (2008). Standring S. *Gray's Anatomy*. ChurchillLivingstone Elsevier. 40th Edition, 2008.
167. Ayazoglu Demir E, Mentese A, Kucuk H, Turkmen Alemdar N, Demir S (2022). p-Coumaric acid alleviates cisplatin-induced ovarian toxicity in rats. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 48: 411–419.
168. kaygusuzoglu E, Caglayan C, Kandemir FM, Yıldırım S, Kucukler S, Kılınç MA, Sağlam YS (2018). Zingerone ameliorates cisplatin-induced ovarian and uterine toxicity via suppression of sex hormone imbalances, oxidative stress, inflammation and apoptosis in female wistar rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 102: 517–530.
169. Yagi K (1984). Assay for blood plasma or serum. *Methods in enzymology* 105: 328–331.
170. Uchiyama M, Mihara M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues

- by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry* 86: 271–278.
171. H A (1987). Aebi H, (1987). *Methods of Enzymatics Analysis*. 3: 273-285.
 172. Paglia DE, Valentine WN (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 70: 158–169.
 173. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
 174. Kushner B, Allen PD, Crane BT (2016). Frequency and demographics of gentamicin use. *Otology and Neurotology* 37: 190–195.
 175. Servais H, Van Der Smissen P, Thirion G, Van Der Essen G, Van Bambeke F, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP (2005). Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: Involvement of lysosomes and mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206: 321–333.
 176. Koban Y, Genc S, Bilgin G, Cagatay HH, Ekinici M, Gecer M, Yazar Z (2014). Toxic anterior segment syndrome following phacoemulsification secondary to overdose of intracameral gentamicin. *Case reports in medicine* 2014: 143564.
 177. Narayana K (2008). An aminoglycoside antibiotic gentamycin induces oxidative stress, reduces antioxidant reserve and impairs spermatogenesis in rats. *The Journal of toxicological sciences* 33: 85–96.
 178. Zhao Y, Chen M, Zhao Z, Yu S (2015). The antibiotic activity and mechanisms of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse extract against food-borne pathogens. *Food chemistry* 185: 112–118.
 179. Boesch-Saadatmandi C, Wagner AE, Wolfram S, Rimbach G (2012). Effect of quercetin on inflammatory gene expression in mice liver in vivo – role of redox factor 1, miRNA-122 and miRNA-125b. *Pharmacological Research* 65: 523–530.
 180. Jahan S, Abid A, Khalid S, Afsar T, Qurat-Ul-Ain, Shaheen G, Almajwal A, Razak S (2018). Therapeutic potentials of Quercetin in management of polycystic ovarian syndrome using Letrozole induced rat model: A histological and a biochemical study. *Journal of Ovarian Research* 11: 1–10.

181. Hong Y, Yin Y, Tan Y, Hong K, Jiang F, Wang Y (2018). Effect of quercetin on biochemical parameters in letrozoleinduced polycystic ovary syndrome in rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 17: 1783–1788.
182. Holmgren A, Bjornstedt M (1995). [21] Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology* 252: 199–208.
183. Luderer U (2014). Ovarian toxicity from reactive oxygen species. *Vitamins and Hormones* 94: 99–127.
184. Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickanaité E, Segura-Aguilar J (1999). Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 107–116.
185. Boots AW, Li H, Schins RPF, Duffin R, Heemskerk JWM, Bast A, Haenen GRMM (2007). The quercetin paradox. *Toxicology and Applied Pharmacology* 222: 89–96.
186. Choi EJ, Chee KM, Lee BH (2003). Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *European Journal of Pharmacology* 482: 281–285.
187. Alizadeh SR, Ebrahimzadeh MA (2022). Quercetin derivatives: Drug design, development, and biological activities, a review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 229: 114068.
188. Lenard N, Henagan TM, Kumar Maurya P (2022). Health benefits of quercetin in age-related diseases. *Molecules* 2022, Vol 27, Page 2498 27: 2498.
189. Gutteridge JMC (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 41: 1819–1828.
190. Leite NB, Martins DB, Alvares DS, Cabrera MP dos S (2022). Quercetin induces lipid domain-dependent permeability. *Chemistry and Physics of Lipids* 242: 105160.
191. Filipe HAL, Sousa C, Marquês JT, Vila-Viçosa D, de Granada-Flor A, Viana AS, Santos MSCS, Machuqueiro M, de Almeida RFM (2018). Differential targeting of membrane lipid domains by caffeic acid and its ester derivatives. *Free Radical Biology and Medicine* 115: 232–245.
192. Gao W, Pu L, Chen M, Wei J, Xin Z, Wang Y, Yao Z, Shi T, Guo C (2018). Glutathione homeostasis is significantly altered by quercetin via the Keap1/Nrf2 and

- MAPK signaling pathways in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 62: 56.
193. Meng B, Gao W, Wei J, Pu L, Tang Z, Guo C (2015). Quercetin increases hepatic homocysteine remethylation and transsulfuration in rats fed a methionine-enriched diet. *BioMed Research International* 2015.
 194. Choi EJ, Lee BH, Lee K, Chee KM (2005). Long-term combined administration of quercetin and daidzein inhibits quercetin-induced suppression of glutathione antioxidant defenses. *Food and Chemical Toxicology* 43: 793–798.
 195. Cerezetti MB, González SM, Ferraz CR, Verri WA, Rabelo EA, Seneda MM, Morotti F (2021). Impact of the antioxidant quercetin on morphological integrity and follicular development in the in vitro culture of *Bos indicus* female ovarian fragments. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 57: 856–864.
 196. Boots AW, Haenen GRMM, Den Hartog GJM, Bast A (2002). Oxidative damage shifts from lipid peroxidation to thiol arylation by catechol-containing antioxidants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1583: 279–284.
 197. Boots AW, Kubben N, Haenen GRMM, Bast A (2003). Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308: 560–565.
 198. Vieira-Frez FC, Sehaber-Sierakowski CC, Perles JVCM, Bossolani GDP, Verri WA, Nascimento RC do, Guarnier FA, Bordini HP, Blegniski FP, Martins HA, et al. (2020). Anti- and pro-oxidant effects of quercetin stabilized by microencapsulation on interstitial cells of Cajal, nitrergic neurons and M2-like macrophages in the jejunum of diabetic rats. *NeuroToxicology* 77: 193–204.
 199. Robaszkiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G (2007). Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biology International* 31: 1245–1250.
 200. Kumar Mishra S, Singh P, Rath SK (2013). Protective effect of quercetin on chloroquine-induced oxidative stress and hepatotoxicity in mice. *Malaria Research and Treatment* 2013.
 201. Ranawat P, Kaushik G, Saikia UN, Pathak CM, Khanduja KL (2013). Quercetin

- impairs the reproductive potential of male mice. *Andrologia* 45: 56–65.
202. Shahzad H, Giribabu N, Muniandy S, Salleh N (2014). Quercetin induces morphological and proliferative changes of rat's uteri under estrogen and progesterone influences. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7: 5484.
 203. Van Der Woude H, Ter Veld MGR, Jacobs N, Van Der Saag PT, Murk AJ, Rietjens IMCM (2005). The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. *Molecular Nutrition & Food Research* 49: 763–771.
 204. Benassayag C, Ferre F, Perrot-Applanat M (2002). Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. *Journal of Chromatography B* 777: 233–248.
 205. Ranelletti FO, Ricci R, Larocca LM, Maggiano N, Capelli A, Scambia G, Benedetti-Panici P, Mancuso S, Rumi C, Piantelli M (1992). growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *International Journal of Cancer* 50: 486–492.
 206. Basini G, Santini SE, Bussolati S, Grasselli F (2009). the phytoestrogen quercetin impairs steroidogenesis and angiogenesis in swine granulosa cells in vitro. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009.
 207. Hodiamont CJ, van den Broek AK, de Vroom SL, Prins JM, Mathôt RAA, van Hest RM (2022). clinical pharmacokinetics of gentamicin in various patient populations and consequences for optimal dosing for gram-negative infections: an updated review. *Clinical Pharmacokinetics* 2022 61:8 61: 1075–1094.
 208. Gencer M, Karaca T, Güngör ANC, Hacivelioglu SÖ, Demirtaş S, Turkon H, Uysal A, Korkmaz F, Coşar E, Hanci V (2014). The protective effect of quercetin on IMA levels and apoptosis in experimental ovarian ischemia-reperfusion injury. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 177: 135–140.
 209. Ferenczyova K, Kalocayova B, Bartekova M (2020). Potential implications of quercetin and its derivatives in cardioprotection. *International Journal of Molecular Sciences* 21.
 210. Dong R, Wang D, Wang X, Zhang K, Chen P, Yang CS, Zhang J (2016). Epigallocatechin-3-gallate enhances key enzymatic activities of hepatic thioredoxin

- and glutathione systems in selenium-optimal mice but activates hepatic Nrf2 responses in selenium-deficient mice. *Redox Biology* 10: 221–232.
211. Mine Y, Katayama S (2008). Antioxidative stress peptides. *ACS Symposium Series* 993: 213–228.
 212. Ishii T, Mori T, Tanaka T, Mizuno D, Yamaji R, Kumazawa S, Nakayama T, Akagawa M (2008). Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate through autoxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 45: 1384–1394.
 213. Poljsak B, Milisav I (2012). The neglected significance of “antioxidative stress.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi:10.1155/2012/480895.
 214. Xiao W, Loscalzo J (2020). metabolic responses to reductive stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 32: 1330.
 215. Pérez-Torres I, Guarner-Lans V, Rubio-Ruiz ME (2017). Reductive stress in inflammation-associated diseases and the pro-oxidant effect of antioxidant agents. *International Journal of Molecular Sciences* 18.
 216. Lee E-S, Lee H-E, Shin J-Y, Yoon S, Moon J-O (2003). The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *The journal of pharmacy and pharmacology* 55: 1169–1174.
 217. Rahdar A, Hasanein P, Bilal M, Beyzaei H, Kyzas GZ (2021). Quercetin-loaded F127 nanomicelles: Antioxidant activity and protection against renal injury induced by gentamicin in rats. *Life Sciences* 276: 119420.
 218. Liu T, Yang Q, Zhang X, Qin R, Shan W, Zhang H, Chen X (2020). Quercetin alleviates kidney fibrosis by reducing renal tubular epithelial cell senescence through the SIRT1/PINK1/mitophagy axis. *Life Sciences* 257: 118116.