

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

**RATLARDA OTOLOG İNTRAPERİTONEAL OVER  
TRANSPLANTASYONUNDA BENFOTİAMİN VE  
N-ASETİLSİSTEİN KULLANIMI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Sevim TUNCER CAN**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Remzi ATILGAN**

**ELAZIĞ  
2016**

## DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Murad ATMACA

## DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Mehmet ŞİMŞEK

**Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

\_\_\_\_\_  
Doç. Dr. Remzi ATILGAN

**Danışman**

## Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgisinden ve tecrübesinden yararlandığım ve uzmanlık tezimde büyük destek ve katkısı olan tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Remzi ATILGAN'a,

Her konuda desteklerini esirgemeyen, deneyim ve yardımları ile bu alanda yetişmemde katkısı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet ŞİMŞEK, Doç.Dr. Burçın KAVAK, Doç.Dr. Alpaslan AKYOL, Doç. Dr. Z.Sema ÖZKAN, Yrd. Doç. Dr. Ebru KAVAK, Y.Doç.Dr. Şehmuz Pala, Yrd. Doç. Dr. Şeyda YAVUZKIR, Yrd. Doç. Dr. Melike BAŞPINAR'a

Tezimin her aşamasında tasarım ve sürdürülmesi, materyal temini, preperat değerlendirilmesi, istatistik aşamasında bana yardımlarını esirgemeyen Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr.Gökhan ARTAŞ'a, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. İsmail DEMİREL'e

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim dalında birlikte çalıştığım araştırma görevlisi, hemşire ve personel arkadaşlarıma,

Yoğun çalışma sürecimde sonsuz sevgi ve ilgisi ile her zaman yanımda olan ve destekleri ile bana güç veren sevgili eşime

Sonsuz teşekkür ederim...

## ÖZET

Over transplantasyonunda çözülmemiş en önemli konulardan birisi iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesidir. Bu nedenle, serbest radikal üretimini azaltmak üzere antioksidanlar uygulanması over naklinden sonra iskemi ve reperfüzyon hasarının sonuçlarına karşı önemli bir ilaç hedefi olarak kabul edilebilir. Bu çalışmada over transplantasyonunda N-asetilsistein ve benfotiamin kullanılarak transplantasyon sonrası oluşacak hasara karşı benfotiamin ve N-asetilsistein etkileri araştırıldı.

N-asetil sistein doğal bir aminoasit olan L- Sisteinin N-asetillenmiş türüdür. Asetil sistein mukolitik bir ajan ve sistein proglutatyen yapısında olan serbest radikal tutucu endojen bir antioksidandır. Oksidatif strese glutatyon havuzunu bir glutatyan prekürsörü olarak besler, glutatyon redoks siklusu, endoteli korumada iyi bir defans sistemi sağlar. Benfotiamin Vitamin B1'in yağda çözünen halidir. Benfotiaminin reaktif oksijen türleri üzerinde baskılayıcı olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir.

Çalışmada, 28 adet 12-14 haftalık Wistar albino cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Deneysel hayvanları 4 gruba ayrıldı. . Grup I: Kontrol grubu olarak kullanıldı Grup II: Transplantasyon grubu olarak kullanıldı Grup III: Transplantasyon grubuna transplantasyonda 1 gün önce ve sonrasında 3 hafta boyunca 75 mg/kg/gün benfotiamin oral gavaj yoluyla uygulandı Grup IV: Transplantasyon grubuna transplantasyondan 1 gün önce ve sonrasında 7 gün boyunca 150 mg/kg/gün N-asetilsistein intraperitoneal uygulandı.

Deneysel süresi sonunda tüm gruplardaki sıçanlar anestezisi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından sıçanların over dokuları hızla çıkarılıp uygun fiksatiflerle tespit edilip ardından histolojik takip serilerinden geçirilip parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan doku kesitlerine Masson-Trikrom boyası yapılarak gruplar arası histopatolojik farklılıklar incelendi. Ayrıca bu kesitlere TUNEL tekniği uygulanarak apoptotik hücreler tespit edildi. Ayrıca dokularda Toplam Antioksidan Durum (TAS)-Toplam Oksidan Durum (TOS) aktivitesine bakılacağından dokular çalışma gününe kadar -80 °C'de saklandı.

Over dokusunda kontrol grubu ile kıyaslandığında transplantasyon yapılan grupta apoptotik hücreler, fibrozis, oksidatif hasar, inflamatuvar hücre düzeyinde belirgin artış izlendi, transplantasyon yapılan grupla kıyaslandığında ise benfotiamin

ve NAC verilen gruplarda bu değişikliklerde anlamlı bir azalma izlendi. Over rezervi açısından kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda primordial folikül sayısı azalmıştı tedavi grupları arasında anlamlı fark yoktu, sekonder, primer folikül, corpus luteum açısından gruplar arasında fark yoktu. Sonuç olarak; Transplantasyon, over dokusunda iskemi-reperfüzyona bağlı oksidatif hasar sonucu apoptozis, nekroz, fibrozisde artışa neden oldu. Benfotiamin ve NAC bu hasarı azaltmada eşit derecede ve etkili bulundu.

**Anahtar kelimeler:** Over transplantasyonu, N-asetilsistein, Benfotiamin



## ABSTRACT

### THE EFFECT OF BENFOTIAMINE AND N-ACETYLCYSTEINE IN AUTOLOGOUS INTRAPERITONEAL TRANSPLANTATION OF THE OVARY IN RATS

One of the most important unresolved issues in the ovary transplantation is prevention of ischemia reperfusion injury. Therefore, application of antioxidants to reduce free radical generation after ovarian transplant can be regarded as an important drug target against the consequences of ischemia and reperfusion injury. In this study, using N-acetylcysteine and benfotiamine over transplantation effect of N-acetylcysteine and benfotiamine were investigated against injury induced by transplantation.

N-acetylcysteine, is a N-acetylated species of natural amino acid L-cysteine. Acetylcysteine is a mucolytic agent and endogenous antioxidants, free radical scavengers the structure of sisteinproglutaty. As a glutathione precursor feeds glutathione pool during oxidative stress, glutathione redox cycle, provides a good defense system in the endothelium protection. Benfotiamine is a fat-soluble form of Vitamin B1. Benfotiamine as inhibitor on reactive oxygen species it has been shown in some studies.

In the study, total number of 28 Wistar Albino 12-14 week old female rats used and were divided into 4 groups. Group I was used as the control group. Group II was used as the transplant group. Group III 1 day before and after the transplantation for 3 weeks was administered by oral gavage 75 mg / kg / day benfotiamine. Grup IV 1 day before and after the transplantation for 7 days 150 mg/kg/day N-acetylcysteine was administered intraperitoneally.

The all group rats were decapitated under anesthesia at the end of the experimental period. After decapitation ovarian tissues of the rats removed quickly, then detected by appropriate fixative passed through the histologic follow-up series and embedded in parafin wax. The tissue sections from paraffin blocks Masson trichrome stain by applying analyzed histopathological differences between the groups. In addition to apoptotic cells were detected by applying the TUNEL technique in this section. Also with the aim look at the total antioxidant status (TAS) -Total

oxidant status (TOS) activities in tissues, tissues were stored at -80 ° C until the working day.

When compared with the control group in the transplant group was observed apoptotic cells in ovarian tissue, fibrosis, oxidative damage, a significant increase in levels of inflammatory cells. When benfotiamine and NAC-treated group compared with transplantation group, observed by a significant decrease at these changings. In terms of ovarian reserve in all groups compared with the control group, the number of primordial follicles was reduced but no significant difference between treatment groups. There was no difference between groups in terms secondary and primary follicles, corpus luteum.

As a result; the ovarian transplantation caused increased apoptosis, necrosis, fibrosis as a result of oxidative damage caused by ischemia-reperfusion. Benfotiamine and NAC applications were found equally and effectively reduce this damage.

**Keywords:** N-acetylcysteine, Benfothiamin, Ovarian transplantation

## İÇİNDEKİLER

<b>BAŞLIK SAYFASI</b>	<b>i</b>
<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>viii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>x</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Genel bilgiler	2
1.1.1. Overler	2
1.1.1.1. Over Anatomisi	2
1.1.1.2. Over Embriyolojisi	4
1.1.1.3. Over Histolojisi	5
1.1.1.5. Primordiyal Follikül Seçilimi (Primordiyal Follikülden Primer Folliküle Geçiş)	8
1.1.1.6. Primer Follikül	9
1.1.1.7. Sekonder Follikül	10
1.1.1.8. Antral (Graaf) Follikül	11
1.1.1.9. Folikül Atrezisi	11
1.1.1.10. Ovulasyon	11
1.1.1.11. Oogenez	12
1.1.1.12. Korpus Luteum	12
1.1.1.13. Over Rezervi	13
1.1.1.14. Over rezervini belirlemek için kullanılan testler;	14
1.1.1.15. Rodentlerde Follikül Gelişiminin Kronolojisi	19
1.1.1.16. Östrus Siklusu	19
1.2. N-Asetilsistein	20
1.2.3.1. Benfotiamin	23

<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>27</b>
2.2. Deneyin Yapılışı	27
2.1. TAS Düzeylerinin Ölçümü	29
2.2. TOS Düzeylerinin Ölçümü	29
2.3. TUNEL Metodu	29
2.3. Histolojik Çalışma	30
2.4. İstatistiksel Analiz	31
<b>3. BULGULAR</b>	<b>32</b>
3.1. TAS-TOS Düzeyi Sonuçları	32
3.2. TUNEL Bulgular	32
3.3. Histolojik Bulgular	36
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>41</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>48</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>64</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Standart rat yemi	27
<b>Tablo 2.</b> TUNEL Boyama Prosedürü.	30
<b>Tablo 3.</b> Histolojik takip serileri	31
<b>Tablo 4.</b> TAS-TOS Düzeyi Sonuçları	32
<b>Tablo 5.</b> Apoptotik indeks (%)	33
<b>Tablo 6.</b> Over dokusunun Masson's trichrome ile boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi	36



## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b>	İnsanda ovaryumun yerleşimi ve yapısı	3
<b>Şekil 2.</b>	Over anatomisi ve kanlanması	3
<b>Şekil 3.</b>	Ovaryumun histolojisi	7
<b>Şekil 4.</b>	Foliküler gelişim (Folikülogenez)	8
<b>Şekil 5.</b>	Primordiyal, primer ve sekonder follikülün morfolojik görünümü	9
<b>Şekil 6.</b>	Yaşla azalan follikül havuzu	15
<b>Şekil 7.</b>	N-asetilsistein kimyasal yapı formülü	20
<b>Şekil 8.</b>	Benfotiaminin kimyasal yapısı.	23
<b>Şekil 9.</b>	Kontrol grubu over dokusu TUNEL pozitif hücreler	33
<b>Şekil 10.</b>	Transplantasyon grubu over dokusu TUNEL pozitif hücreler	34
<b>Şekil 11.</b>	Transplantasyon+Benfotiamin grubu over dokusu TUNEL pozitif hücreler (kırmızı ok).	34
<b>Şekil 12.</b>	Transplantasyon+NAC grubu over dokusu TUNEL pozitif hücreler	35
<b>Şekil 13.</b>	Pozitif kontrol. Meme dokusu TUNEL pozitif hücreler	35
<b>Şekil 14.</b>	Kontrol grubuna ait normal görünümlü over dokusu.	37
<b>Şekil 15.</b>	Transplantasyon grubuna ait over dokusu.	37
<b>Şekil 16.</b>	Transplantasyon + Benfotiamin grubuna ait over dokusu.	38
<b>Şekil 17.</b>	Transplantasyon + NAC grubuna ait over dokusu. (Kahverengi yıldız: kronik iktihabi (lenfomonositik) hücreler)	38
<b>Şekil 18.</b>	Kontrol grubuna ait normal görünümlü over dokusu.	39
<b>Şekil 19.</b>	Transplantasyon grubuna ait over dokusu.	39
<b>Şekil 20.</b>	Transplantasyon+Benfotiamin grubuna ait over dokusu.	40
<b>Şekil 21.</b>	Transplantasyon+NAC grubuna ait over dokusu. (Siyah ok: Fibrozis)	40

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>AFS</b>	: Bazal antral follikül sayımı
<b>AGE</b>	: Glikasyon son ürünleri
<b>CCCT</b>	: Klomifen sitrat challenge test
<b>CYP2E1</b>	: Sitokrom P450 2E1
<b>DM</b>	: Diabetes mellitus.
<b>EFORT</b>	: Egzojen FSH ovaryan rezerv test
<b>EPA</b>	: Çevre Koruma Örgütü (Environmental Protection Agency)
<b>FSH</b>	: Folikül Uyarıcı Hormon
<b>GAST</b>	: GnRH agonist stimülasyon test
<b>GVBD</b>	: Germinal Vesicle Break Down
<b>GnRH</b>	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
<b>GSH</b>	: Glutasyon okside formu
<b>GSSG</b>	: Glutasyon redükte formu
<b>hCG</b>	: Human Chorionic Gonadotrophin
<b>IARC</b>	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Enstitüsü
<b>KB</b>	: Kan basıncı
<b>KC</b>	: Karaciğer
<b>LH</b>	: Lüteinleştirici Hormon
<b>MIF</b>	: Antimüllerian Hormon
<b>MII</b>	: Metafaz II
<b>MS</b>	: Multipl skleroz
<b>NF-B</b>	: Nükleer faktor-kappa beta
<b>NAC</b>	: N-asetilsistein
<b>OOV</b>	: Bazal over volumünün ölçülmesi
<b>Oİ</b>	: Ovulasyon indüksiyonu
<b>OSHA</b>	: The Occupational Safety and Health Administration
<b>PTH</b>	: Parathormon
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>TGF-β</b>	: Büyüme faktörü-beta

## 1. GİRİŞ

Serviks kanseri için uygulanan radyoterapi veya çocukluk çağı tümörlerinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapiye bağlı olarak over yetmezliği gelişebilir (1-3). Pelvik radyasyonda uygulanan doz çok önemlidir. Pelvise uygulanan doz 50 Gy olduğunda %60, 80 Gy ve üzerindeki dozlarda ise % 100 sıklıkta over yetmezlik ortaya çıkar (4). Over transplantasyonu kemoterapi ve radyoterapi alan üreme potansiyeli olan kanser hastalarında doğurganlığın korunması için gelecek vaat eden bir teknoloji olarak kullanılır (5-6). Over yetmezliği gelişen vakalarda estrogen eksikliğinin giderilmesi için ömür boyu hormon replasmanı zorunluluğu vardır. Oysa otoimmün hastalığı olmayan, hipotalomohipofizer aksı düzenli işlev gören vakalarda over transplantasyonu kronik ilaç kullanımına etkili bir seçenek olabilir (1).

Over transplantasyonunda iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesi çözülmemiş en önemli konulardan birisidir (7). Nakledilen overin neovaskülarizasyonu sırasında reperfüzyon periyodunu takiben iskemi başlangıcında reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi olur. Endotel hasarındaki neden sitokin üretimindeki artış ve adezyon moleküllerinin aktivasyonunu takiben inflamatuvar cevabın başlamasıyla dokudaki şişme ve mikrovasküler geçirgenliğin artmasıdır (8, 9). ROS üretimi ayrıca iskemik dokulardaki lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi hücrel makromoleküllerinin oksidatif hasarı ile direk ilişkilidir (10). Tüm bu olaylar transplante edilen over dokusunda masif foliküler kaybına yol açar (6, 8, 11, 12). Bu nedenle, serbest radikal üretimini azaltmak üzere antioksidanlar uygulanması over naklinden sonra iskemi ve reperfüzyon hasarının sonuçlarına karşı önemli bir ilaç hedefi olarak kabul edilebilir.

N-asetil sistein doğal bir aminoasit olan L- Sisteinin N-asetillenmiş türüdür. Asetil sistein mukolitik bir ajan ve sistein proglutatan yapısında olan serbest radikal tutucu endojen bir antioksidandır (13). Oksidatif strese glutatyon havuzunu bir glutatyan prekürsörü olarak besler, glutatyon redoks siklusu, endoteli korumada iyi bir defans sistemi sağlar (14).

Moleküler yapısı ile hücre içine kolayca girebilen Asetilsistein, burada deasetillenerek L-sisteine dönüşür. L-sistein bir glutatyon prekürsörüdür ve glutatyon sentezini artırır. Glutatyon ise endojen ve eksojen sitotoksik maddelerin, oksijen radikallerinin hücreye zarar vermesini önleyen hücre bütünlüğünün ve işlevlerinin

devamlılığı için çok önemli, endosellüler mekanizmada temel rolü olan yüksek reaktiflikte bir tripeptittir. Glutasyon redükte (GSH) ve okside (GSSG) olmak üzere iki şekilde bulunur. Glutasyonun redükte formu (GSH) oksidatif hasara karşı korumada çok önemli rol oynar (15).

Benfotiamin; B1 vitamininin yağda eriyen türüdür. Normal suda çözülebilen B1 vitaminine tiamin, özel yağda çözülebilen B1 vitaminine ise benfotiamin denilir. Benfotiamin transketolaz aktivitesinde artışa neden olarak pentoz fosfat yolunu aktive eder. Bu yolağın aktive olmasıyla vasküler hasar oluşumuna neden sayılan heksosamin yolağı, hücre içi AGE oluşum yolu ve DAG/Protein kinaz C yolaklarının etkilerinin azalmasına sebebiyet verir (16).

Hayvan deneylerinde uygulanan yüksek doz tiamin ve benfotiamin kullanımının, hayvanlarda transketolaz aktivitesinde artışa ve bununla birlikte albuminüri düzeyinde azalmaya neden olmuştur (17).

Tiamin kökenli birleşimlerin eşsiz kaynaklarından biri olan Benfotiamin, allitiamin olarak isimlendirilen, soğan, taze soğan, kızarmış veya ezilmiş sarımsakta ve pırasa gibi sebzelerde eser miktarda bulunur (18).

## **1.1. Genel bilgiler**

### **1.1.1. Overler**

#### **1.1.1.1. Over Anatomisi**

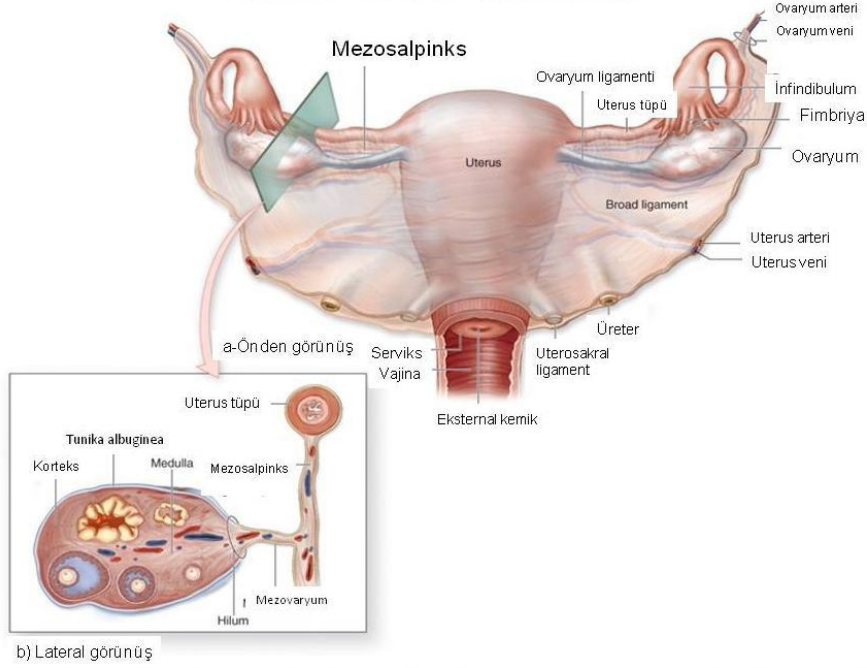
Overler, lateralde infundibulopelvik ligament, medialde uteroovayan ligament ile asılı olarak uterus ile pelvik duvar arasında bulunan bir çift gonadal organdır. Over ağırlığı 2-8 gr arasında ve boyutu genellikle 5x3x3 cm civarındadır. Korteks ve medulladan oluşan overler mezoovaryum ile devam eden yassılaştırmış tek kat kuboidal epitelden meydana gelmiştir. Kortekste özelleştirmiş bir stroma ve değişik fazlarda folliküller bulunur.

Medulla, fibromüsküler tabaka ile kan damarlarını içeren küçük bir alan olan hiler bölgede yer alır. Overler, arteria ovaricadan beslenir (22).

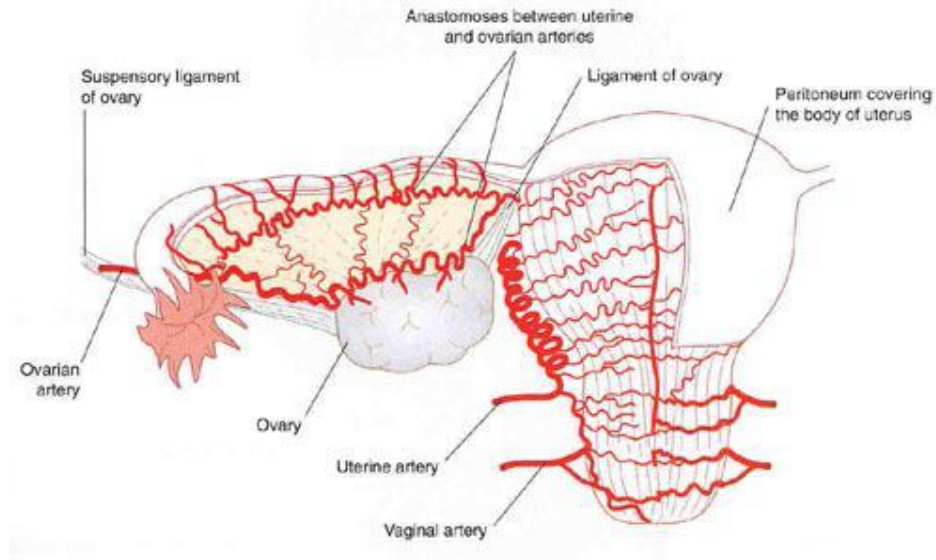
Aortanın bir dalı olan arteria ovarica, infundibulopelvik ligament üzerinden overin mezoovaryal sınırında arteria uterinanın ovaryan dalı ile anastomoz yapar ve

buradan çıkan yaklaşık 10 arterial dal ile medullaya over hilusundan girer (Şekil 2) (23-26).

Overin venleri, arterlerini izleyerek hilusta bir araya gelerek pleksus meydana getirip vena ovaricalara açılır. Sol vena ovarica renal vene, sağ vena ovarica vena cava inferiora açılır (23).



Şekil 1. İnsanda ovaryumun yerleşimi ve yapısı (1)



Şekil 2. Over anatomisi ve kanlanması (2)

### 1.1.1.2. Over Embriyolojisi

Kompleks bir süreç olan cinsiyetin farklanmasının bir kısmında otozomal olmak üzere çok sayıda geni içerir. Testis belirleyici faktör genini taşıyan Y kromozomu anahtar rol oynar. Bu faktörün varlığı veya yokluğu gonadal farklanma üzerinde doğrudan etkili olur ve bir şelale gibi Y kromozomundan aşağı doğru, rudimenter cinsiyet organlarının kaderini belirlemek için birçok başka genin harekete geçmesini sağlayacak düğmeye basar (19).

Fertilizasyon aşamasında genetik açıdan daha embriyonun cinsiyeti belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin 7. haftasına kadar gonadların dişi veya erkek morfolojik özellikleri yoktur (28).

Çöломik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşan, gonadlar bir çift gonadal kabarıklık şeklinde oluşurlar. Gelişimin erken evrelerinde, primordiyal germ hücreleri yolk kesesinin allontoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında gelişir. Barsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketler yaparak ilerleyerek primitif gonadlara 5. haftanın başında ulaşır ve genital kabarıklıkları da 6. haftada işgal ederler. Germ hücreleri gelişimin 6. haftasına kadar genital kabarıklıklar içinde bulunmaz.

Gonadların over veya testise farklanmasında, primordiyal germ hücrelerinin indükleyici etkisi vardır ve genital kabarıklığa ulaşamazlarsa, gonadlar gelişemez (29).

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşılmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabarıklığın çöломik epiteli proliferer olur ve epitel hücreleri altındaki mezenşim doku içine girerek, burada primitif cinsiyet kordonları denen irregüler şekilli kordonları oluştururlar ve bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır. Farklılanmamış gonad olarak bilinen bu dönemdeki erkek veya dişi gonadlarının birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün değildir (29).

Başlangıçta çöлом epitelinden mezenşim içine uzanan primer seks kordonları farklılanmamış gonadın korteksinde, bulunur (30).

Primitif cinsiyet kordonları, XX cinsiyet kromozomuna sahip dişi embriyolarda düzensiz hücre kümelerine ayrılır. Bunlar, daha çok overin medullar bölgesinde yerleşir ve sonradan, kaybolarak yerlerini over medüllasını meydana getiren vasküler bir stromaya bırakır.

Dişi gonadın yüzeyel epiteli erkeklerdekinin aksine çoğalmaya devam eder. Yedinci haftada bunlardan alttaki mezenşim içine girmesine rağmen, gene de yüzeye yakın kalmayı sürdüren, kortikal kordonlar denen ikinci nesil kordonlar meydana gelir.

Bu kordonlar dördüncü ayda, bir veya daha çok sayıdaki primitif germ hücrelerini saran izole hücre topluluklarına ayrılır. Zamanla bu germ hücreleri oogoniya dönüşürken, yüzey epitelinden aşağıya göçen ve germ hücrelerini saran epitel hücrelerinden de folliküler hücreler oluşur. Cinsiyet spermatositin X veya Y kromozomu taşıyıp taşımasına bağlıdır ve fertilizasyon sırasında belirlenir. XX kromozomu taşıyan bir embriyoda, kortikal kordonların sekonder generasyonu meydana gelirken gonadın meduller kordonları geriler. XY kromozomu taşıyan embriyolarda ise, sekonder kortikal kordonlar gelişemez ve meduller kordonlar, testis kordonlarına dönüşür (29).

#### **1.1.1.3. Over Histolojisi**

Overlerin, gametlerin üretilmesi (gametogenez) ve steroid yapıdaki hormonların (östrojen ve progesteron) sentezlenip salgılanması olmak üzere başlıca iki önemli fizyolojik görevi vardır. Kadınlar puberteden itibaren, üreme çağı boyunca devamlı olarak aylık üreme sikluslarına girerler. Bu olaylarda hipotalamus, hipofiz bezi, overler ve uterus işlevleri önemlidir. Hipotalamustaki nörosekretuar hücreler, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) sentezler ve bu hormonu hipofiz bezinin ön lobuna hipofizyal portal sistem aracılığıyla iletir. Hipofizde üretilen ve overler üzerine etkili iki hormonun salınmasını GnRH uyarır. Bunlar; ovulasyonu tetikleyen, follikül hücreleri ve korpus luteumu uyararak progesteron üretimini sağlayan Luteinleştirici hormon (LH) ve over folikülünün gelişimini ve folikül hücrelerinden östrojen salınımını uyararak Follikül stimüle eden hormon (FSH) 'dur (29, 31).

Overlerin yüzeyindeki germinal epitel gençlerde tek katlı kübik, ileri yaşlarda ise tek katlı yassı epitelden oluşur. Çoğu histolojik preparatlarda germinal epitel kolaylıkla döküldüğünden ya bir bölümü görülür ya da hiç görülmez. Germinal epitel ultrastrüktürel olarak incelendiğinde peritona benzer. Germinal epitel hücrelerinde glikojen, epidermal büyüme faktörleri, mukopolisakkaritler, progesteron ve östrojen reseptörleri bulunur (20, 21, 24, 30, 32-34).

Germinal kök hücreleri, germinal epitel içinde bulunur. Büyük, oval şekilli ve mitotik olarak aktiftir ve ayrıca oosit ve onu çevreleyen granüloza hücrelerinin bipotent kaynağıdır (35, 36).

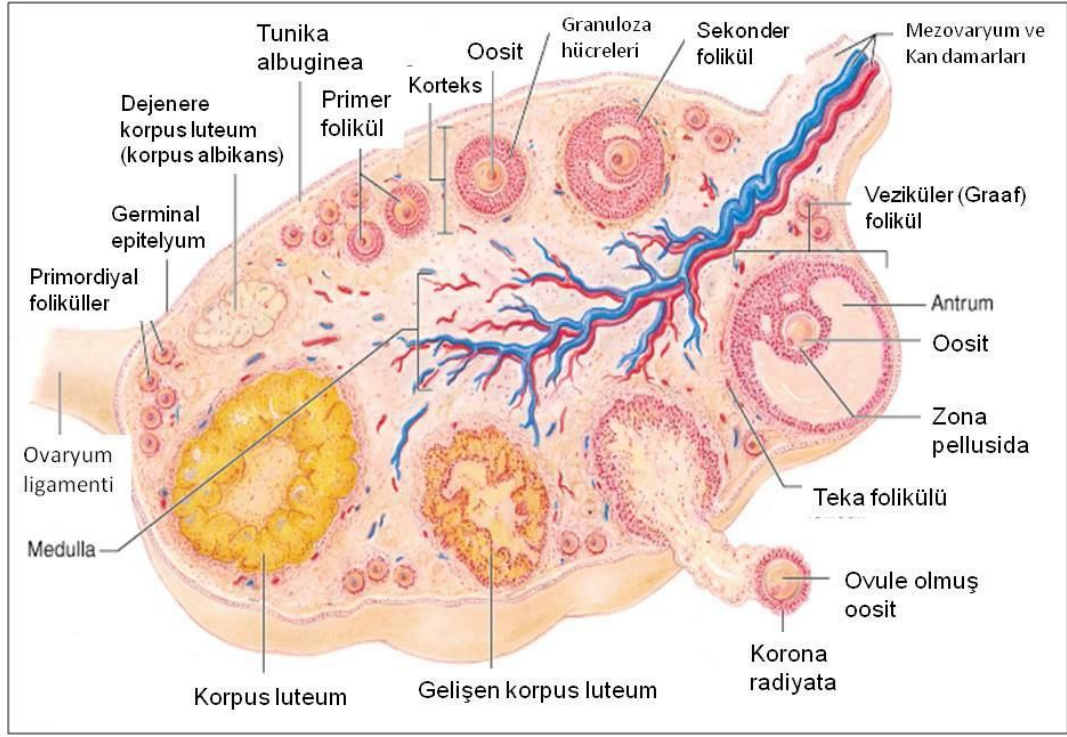
Tunika albuginea, germinal epitelin hemen altında zayıf olarak damarlanmış, kollajen fibrilleri over yüzeyine paralel yerleşen ve yoğun, düzensiz bağ dokusudur. Makroskopik olarak, overlerin pembemsi-gri renkte görünmesi bu tabakadan dolaydır. Tunika albuginea ileri yaşlarda gençlere göre daha kalındır (20, 30-32, 37)

Over kesitlerinde içte medulla (substantia medullaris), dışta korteks (substantia corticalis) görülür. Bu iki tabaka arasında kesin bir sınır yoktur (20, 32, 33, 38-40).

Gelişimin farklı evrelerinde olan foliküller overin korteksinde izlenir. Kortekste puberteden önce sadece primordiyal foliküller, puberteden sonra ise primer, sekonder ve antral foliküller bulunur. Kortekste cinsel olgunluk döneminde bu foliküllerden başka korpus luteum ve atretik foliküller de bulunur. Menopoz ile birlikte foliküllerin sayısı oldukça azalır (34, 39, 41, 42).

Kortekste foliküller arasında yer alan gevşek bağ dokusunda, çok sayıda bağ dokusu hücreleri, kollajen ve retikulum lifleri bulunur. Elastik liflere germinal epitelin hemen altında ve kan damarlarının çevresinde rastlanır (32, 34, 30, 40).

Over medullasında kollajen lif demetleri, elastik lif ağları, büyük kan damarları, lenf damarları, sinir demetleri ve düz kas lifleri bulunur ve gevşek fibroelastik bağ dokusu yapısındadır. Elastik ve kollajen liflerin sayısı medullada kortekse göre fazladır. Bunların yanında medullada interstisyel ve hilus hücreleri de bulunur. Foliküllerin atreziye uğramasından sonra teka interna hücreleri tek tek ya da gruplar halinde kalır ve interstisyel hücreler ya da bezler oluşur. İnsanda menstruasyondan önce bazı interstisyel hücreleri östrojen veya progesteron salgılar. İlk menstruasyonda interstisyel hücrelerin çoğunluğu involusyona uğrar ve fonksiyonları azalır. Hilus hücreleri ise testisin Leydig hücrelerine benzer organel yapısında olup, lipid bakımından zengin ve Reinke kristallerine benzer yapılar hücre içinde bulundurur. Hilus hücrelerinden steroid hormon olarak androjen salgılanır (20, 24, 32, 34, 39, 40)



**Şekil 3.** Ovaryumun histolojisi (43)

#### 1.1.1.4. Folliküler Gelişim (Follikülogenez)

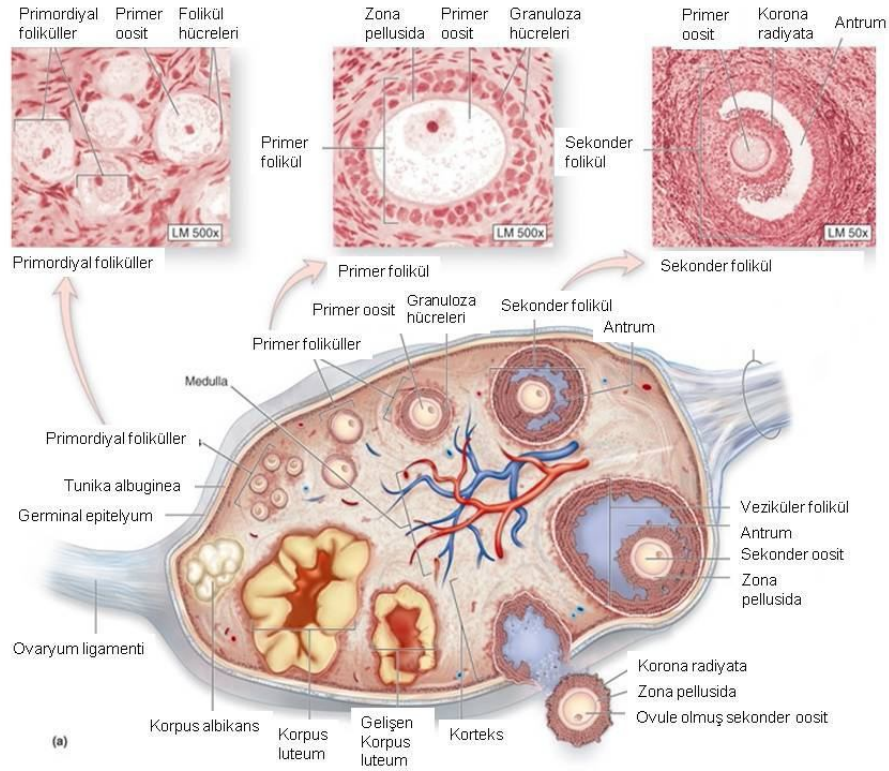
Overin korteks tabakasında follikülogenez meydana gelir. Dişi germ hücreleri, overlerin farklılaşmasının ardından fetal dönemde oogonia adını alır. Bu hücreler insanda her bir overde yaklaşık 500.000 primordiyal follikülün bulunduğu bir rezerv meydana getirecek şekilde mitoz bölünme ile çoğalırlar (44).

Follikülogenez, büyüyen follikül havuzundan primordiyal follikülün seçilmesi ile başlayan ve ovulasyon veya atrezi ile biten bir süreçtir. Birinci faz, oositin büyümesi ve farklılaşması ile karakterizedir ve preantral follikül veya gonodotropinden bağımsız faz denir. Preantral faz, otokrin ve parakrin mekanizmalar ile lokal olarak sentezlenen büyüme faktörleri tarafından kontrol edilir. İkinci faza, antral veya gonadotropin bağımlı faz denir ve burada follikülün boyutunda oldukça fazla bir artış meydana geldiği görülür. Gonadotropin bağımlı faz ise FSH (Folikül Uyarıcı Hormon) ve LH (Lüteinleştirici Hormon) ile büyüme faktörleri ile kontrol edilmektedir (45).



Oosit ve follikül hücreleri, bazal lamina sayesinde mikroçevre ile direk olarak temas etmezler. Primordiyal folliküller bağımsız bir kanlanmaları olmadığından endokrin sistemden daha sınırlı olarak etkilenirler (45).

Follikül hücrelerinin mitotik fonksiyon kazanması ve şekillerini yassı epitelden küboidal epitele dönüştürmeleri, follikül seçiliminin histolojik göstergesi olarak gösterilir (Şekil 9). Bunu gen aktivasyonu ve oositin gelişimi izler. Memelilerde seçilimi pozitif veya negatif yönde etkileyen faktörler, granuloza hücresi kaynaklı kit-ligand ve yüksek pitüiter FSH düzeyi gibi aktivatörler, teka hücresi kaynaklı Bone Morphogenic Protein (BMP) ve Mullerian Inhibition Substance (MIS) gibi inhibitörlerdir. Kadında follikül seçiliminin nasıl kontrol edildiği ile ilgili henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır (45).



**Şekil 5.** Primordiyal, primer ve sekonder follikülün morfolojik görünümü (47)

#### 1.1.1.6. Primer Follikül

Primer follikül, primer oosit ve onun etrafında dizilen tek katlı küboidal follikül hücrelerinden oluşur. FSH reseptörü ekspresyonu ve oosit büyümesi ve farklılaşması gibi major olaylar primer follikülde meydana gelir. Primer follikül

unilaminar ve multilaminar olmak üzere ikiye ayrılır. Unilaminar primer follikülde, oosit etrafında tek sıralı folliküller hücreler bulunurken, multilaminar primer follikülde, follikül hücreleri oosit etrafında en az 2 ve daha fazla sayıda sıra meydana getirirler (45).

#### **1.1.1.7. Sekonder Follikül**

Follikülün yapısı preantral follikül gelişimi sırasında değişmeye başlar. Sekonder follikül gelişimi sırasında büyük değişiklikler gözlenir. Sayıca artış gösteren follikül hücrelerine granüloza hücresi denir. Sekonder follikülün oluşumu ile bazal lamina çevresinde stroma hücresi benzeri, teka hücresi adı verilen hücreler meydana gelir. Primer follikülden tam gelişmiş bir sekonder follikül gelişiminde otokrin ve parakrin etki gösteren ve oosit tarafından üretilen büyüme faktörleri etkilidir. Sekonder follikülün gelişiminin devam etmesi ile teka interna ve teka eksterna olarak adlandırılan iki primer teka tabakası meydana gelir. Teka internanın hücreleri tamamen farklılaşmış granüloza hücre tabakasına taşınan bir steroid hormon olan androstenedionu üretirler. FSH hormonu etkisi ile granüloza hücreleri de androstenedionu östrojene çeviren aromataz enzimini sentez ederler. Follikülü saran stromaya dönen östrojen, kan damarları ile kana geçerek tüm vücuda yayılır. Teka eksterna ise, teka internanın çevresinde organize olan fibroblast katmanlarından meydana gelir. Her iki teka tabakası arasında kesin bir sınır bulunmaz (48).

İçteki teka interna tabakası interstisyel hücrelere ve teka eksterna tabakası düz kas hücrelerine dönüşür. Teka tabakalarının gelişmesi ile çok sayıda küçük damar yapıları da anjiyogenez yolu ile gelişir. Follikül çevresi kan dolaşımı başlar ve bu sayede; gonadotropinlerin ve besinlerin buraya taşınması, atıklar ve sekrete edilen maddelerin buradan uzaklaştırılması sağlanır (Şekil 5), (45, 48).

Oosit genomu preantral gelişim süresince tekrardan aktive olur ve oosit büyümeye başlar. Oositin büyüme ve farklılaşmasında, bazı oosit mRNA'larının genetik okunması ile meydana gelen proteinler etkilidirler. Örneğin zona pellusida (ZP) proteinlerini kodlayan ZP-1, ZP-2, ZP-3 ve ZP-4 genlerinin aktivasyonu ile sekrete edilen ZP proteinleri, etrafında oositi korumak için bir tabaka meydana getirirler (44).

#### **1.1.1.8. Antral (Graaf) Follikül**

Granuloza hücrelerinin sayısı ve büyüklüğünde artış; folliküler gelişim devam ederken, FSH hormonu salgılanması sonucu, meydana gelir. Bu sırada hyaluronik asitten zengin bir sıvı follikül içerisinde granuloza hücreleri arasında oluşan boşluklarda birikmeye başlar. Bu aşamadaki folliküle preantral follikül adı verilir. Follikül içerisinde bu biriken sıvı arttıkça birbirleriyle birleşerek sıvı dolu büyük bir boşluk meydana getirir. Bu boşluğa antrum ve bu dönemde büyüyen folliküle de antral follikül adı verilir. Oosit, folliküler kavite içerisinde kumulus hücreleri adı verilen bir miktar hücre ile birlikte kumulus ooforus adı verilen bir yapı meydana getirir. Oositin çevresinde bulunun tek sıralı prizmatik hücrelere korona radyata denir.

Tersiyer veya graaf follikül olgunlaşma aşamasındaki folliküle denir. Teka interna tabakası, kan damarı bakımından zengindir, graaf follikülünü çevreler ve steroid salgısı yapar. Teka eksterna tabakası ise destek görevi görür ve ovaryan stroma ile yakın ilişkidir (Şekil 9) (44, 45).

#### **1.1.1.9. Folikül Atrezisi**

Folliküler atrezi, gelişmekte olan bir follikülün, gelişiminin herhangi bir döneminde, sağlıklı yapısını kaybederek gelişimini durdurmasıdır. Apoptozun aktive olması oosit ve granuloza hücrelerinde atrezide temel olandır. FSH'nin apoptozu önlemedeki öneminden dolayı FSH'nin folikülün yaşamasını sağlayıcı faktör olduğu düşüncesi vardır. Memelilerde folliküllerin %99'u atreziye uğrar. Atreziyi yöneten mekanizma ya da mekanizmalar günümüzde halen tam olarak anlaşılamamıştır (45).

#### **1.1.1.10. Ovulasyon**

Gelişimini tamamlamış olgun bir oositin overlerden atılmasına ovulasyon denir. Memelilerde puberteden menopoza kadar süren siklik bir süreçtir. İnsanda menstrüasyonun başlangıcından itibaren 13-14. günlerinde ovulasyon olur. Her bir overden bir oosit atılıp, ortalama her 28 günde bir tekrar eden bu olaya ovariyal siklus adı verilir. Overlerde her ay 7 ile 12 follikül gelişmeye başlar, fakat diğer folliküller atreziye uğrarken sadece biri dominant follikül olarak seçilerek tam olgunluğa ulaşır. Menstruel siklusun foliküler fazı süresince östrojen salgılayan

dominant follikül, ovulasyondan sonra siklusun luteal fazı boyunca progesteron sentezinden sorumlu olan korpus luteuma dönüşür. Embriyonun implantasyonu için uterus üzerinde, östrojen ve progesteron etkilidir (44).

#### **1.1.1.11. Oogenez**

Gelişmekte olan follikül, preantral dönemden ovulasyon öncesi döneme FSH hormonunun etkisiyle geçer. Menstrual siklusun ortasına denk gelen geç folliküler dönemde, luteinleştirici hormonun (LH) ovulasyondan hemen önce pik yapması ile oositte germinal vezikül yıkılır (Germinal Vesicle Break Down (GVBD)). Oositte, kromozomlar metafaz I evresinden telofaz I evresine geçerek, ovulasyondan hemen önce 1. mayoz bölünme olur. 1. mayoz bölünme sonucu kromatin iki kardeş hücre arasında eşit olarak dağılırken, hücrelerden biri hemen hemen tüm sitoplazmaya sahip büyük bir hücre olarak kalırken, diğeri zona pellusida ile oosit arasındaki perivitellin aralıkta küçük bir hücre olarak kalır ve buna 1. kutup cisimciği ya da 1. polar cisimcik denir. Oosit de sekonder oosit olarak isimlendirilir ve sekonder oosit haploid kromozoma sahiptir. Bu olaylar sonucu çekirdek 2. mayoz bölünme evresine girer. Fertilizasyon gerçekleşirken spermin oosite girmesi ile oosit 2. mayoz bölünmesini tamamlar ve 2. kutup cisimciği atılır. Ovulasyon ile atılan oosit metafaz II (MII) oosit ya da olgun oosit olarak adlandırılır (44).

#### **1.1.1.12. Korpus Luteum**

Folikül duvarında kalan teka interna ve granuloza hücreleri ovulasyonun ardından, vaskülarize olurlar. Bu hücreler LH etkisi ile luteal hücrelere dönüşerek teka lutein ve granuloza lutein hücreleri olarak adlandırılır. Oluşan bu yapı korpus luteum adını alır ve progesteron salgılanmasından sorumludur. Endometriyumda, folliküllerden salgılanan östrojenin etkisi ile ovulasyondan önce proliferasyon görülür, ovulasyondan sonra salgılanan progesteronun etkisi ile sekretuar faza geçerek implantasyona hazır hale gelir. Eğer fertilizasyon oluşmazsa korpus luteum dejenere olur, fibrotik bir doku olan korpus albicans oluşur ve progesteron salgılanmasının azalması ile implantasyon için hazırlanan endometriyum menstrual kanama ile dökülür (menstruasyon). Fertilizasyonun olması durumunda ise gelişen embriyodaki trofoblast hücrelerinin salgıladığı hCG (Human Chorionic

Gonadotrophin) hormonunun etkisi ile korpus luteum dejenere olmaz ve gelişimini sürdürerek gebelik korpus luteumuna dönüşür (45).

#### **1.1.1.13. Over Rezervi**

Doğumdan itibaren over rezervinde, yaşla beraber azalma olmakta, oosit kalitesinde de 35 yaşından itibaren bozulma olmaktadır. Bu rezerv azalmasının mekanizması tam anlamıyla bilinmemektedir. Fakat folikülü atreziye götüren nedenlerin, çevresel faktörler ve hormonal dengesizlik nedeniyle oluşan oksidatif hasar olduğu düşünülmektedir. Zarar gören yaşlı oositin hücre siklusu bozulmakta, mayotik ayrılmama, mozaizm, anoploid oositler ve gebelik kayıpları meydana gelmektedir (49).

İnfertilitenin giderek artan önemli bir nedeni over rezervinde azalmadır. Over dokusunda follikülogenez ve steroidogenez fonksiyonlarını yerine getirecek folliküllerin sayısı, yeterliliği ve kalitesi over rezervi ile tanımlanır. Kadının yaşı ilerledikçe primordiyal folliküllerin apoptoz ile kaybına bağlı olarak over rezervinde azalma görülür. İntrauterin dönemde, 20. gebelik haftasından itibaren over rezervinde azalma başlar. Bu döneme kadar hızlı mitoz ile çoğalan oogoniyaların çoğalması durmakta, daha sonra sayılarında azalma olmakta, yenidoğan döneminde 1-2 milyona, puberte başlangıcında 300-400 bin civarına düşmektedir. Bunların arasından her ay yaklaşık olarak 1000 tanesi, follikülün ovulasyona gidişinin farklı dönemlerinde, atreziye uğramaktadır. Fakat oositlerin kayıp hızı popülasyonlara göre değişiklik gösterir ve bu nedenle overin biyolojik yaşı kronolojik yaşını yansıtmayabilir. Oositlerin prematür kaybı için risk faktörü taşımayan ve menstruel siklusları düzenli olan çoğu kadında over rezervinde azalma görülebilir (50, 51).

Overin yaşlanması da over rezervinde azalmada önemlidir. Geç yaşta çocuk sahibi olma, kadının üretkenliğinde azalmaya neden olmaktadır. Sonunda primordiyal folliküller azalmakta, oosit kalitesi bozulmakta, implantasyon oranı azalmakta, embriyoda kromozomal anomali oranı ve bunun sonucunda abort oranında da artışlar olmaktadır. Over rezervinin bir tarama testi ile önceden değerlendirilmesi infertilite tedavisine başlanmadan önce önemlidir (52).

Prematür over yetmezliği etyolojisinde birçok teori ortaya atılmıştır. Bunlardan bazıları bozulmuş granüloza hücrelerine karşı oluşan otoantikolar,

angiogenesis, patolojik apoptotik aktivite, otokrin ve parakrin faktörlerin etkisidir. Ayrıca ailesel yatkınlık ve genetik temelde önemlidir. Prematür over yetmezliği olanlarda yapısal ve sayısal kromozomal anomali görülme sıklığı gerçekten artmıştır (49).

Over rezervini etkileyen başlıca parametreler şunlardır:

- 1-Yaş
- 2-Geçirilmiş over cerrahisi
- 3-Şiddetli endometriosis
- 4-Obesite
- 5-Sigara icimi
- 6-Çevresel Faktörler (Oksidatif Hasar)
- 7-Anatomik bozukluklar (adezyon gibi)
- 8-Latent veya prematür over yetmezliği
- 9-Daha önce yardımcı üreme tekniklerine kötü yanıt

#### **1.1.1.14. Over rezervini belirlemek için kullanılan testler;**

##### **Statik testler:**

- Kadın Yaşı
- Bazal serum FSH
- Bazal serum östradiol
- Bazal serum inhibin-B
- Bazal serum AMH
- Bazal ovarian volüm
- Bazal antral follikiül sayımı
- Ovarian stromal kan akımı
- Ovarian biopsi

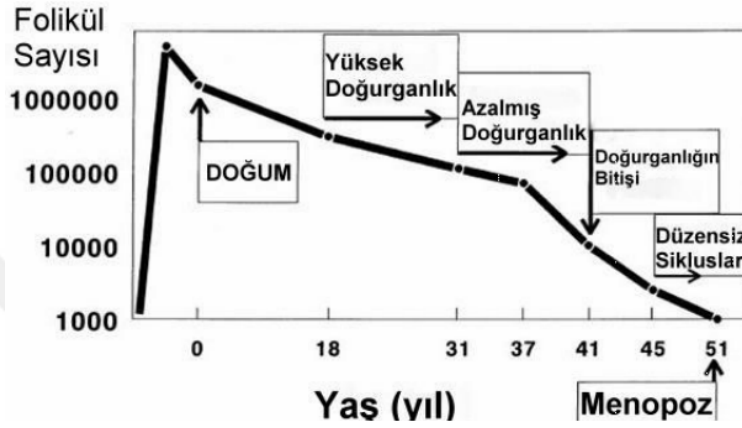
##### **Dinamik testler:**

- Klomifen sitrat challenge test (CCCT)
- GnRH agonist stimülasyon test (GAST)
- Egzojen FSH ovarian rezerv test (EFORT)

### Yaş:

Over rezervinde yaşla birlikte azalma olmasına rağmen biyolojik yaş, kronolojik yaştan daha önemlidir (53).

Yaş, over rezervi için kesin bir epidemiyolojik tahmin yöntemi değilse de, spontan ya da yardımcı üreme teknikleri ile elde edilen gebeliklerin prognozunu da önemlidir (53).



Şekil 6. Yaşla azalan follikül havuzu (54).

Şekil 6'da fertilité durumu belirtilerek yaşa bağı azalan follikül oranları bulunmaktadır (54).

Menopoz'un başlama yaşı 40 ile 60 yaşları arasındadır. Yapılan bir çalışmaya göre ortalama perimenopoz yaşı 47.5 ve ortalama menopoz yaşı 51.3 olduğu görülmüştür (55).

### Serum FSH:

Gonadotropik bir hormon olan FSH, over folliküllerinin gelişimini uyarır. Over rezervinin azalması ile folliküler gelişim bozulmakta ve bunun sonucu olarak kan FSH düzeyi artmaktadır. Siklusun 2 veya 3. günlerinde ölçülen FSH değeri 12 mIU/ml ve üstünde ise overin ovulasyon indüksiyonu veya kontrollü ovaryan hipertimulasyona yanıtı zayıf olacaktır. Bu üst sınır değişebileceği gibi en yüksek değer 25 mIU/ml kabul edilmektedir. FSH değerinde sikluslar arasında dalgalanmalar olmaktadır, bununla beraber en az bir kez yüksek bulunması zayıf over rezervi yönünden anlamlıdır (56, 57).

**Serum E2:**

Siklusun 2 veya 3. günlerinde ölçülen E2 değerlerinin <20 pg/ml nin üzerinde olması siklus iptali için riskin arttığını gösterir (58).

Serum E2'nin ideal değeri <45 pg/ml'dir ve FSH ile beraber değerlendirildiğinde anlamlıdır. Sadece bazal E2 düzeyi ile tedavi sonuçları arasında anlamlı korelasyon yoktur, aynı zamanda yüksek E2 değeri, FSH üzerinde negatif feedback etkili olduğundan FSH'ın yanlış olarak düşük saptanmasına yol açar.

**Serum İnhibin-B:**

İnhibinler dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ) süperailisinin glikoprotein içerikli bir üyesidir. Granüloza ve teka hücrelerinden salınarak hipofiz bezinin FSH sekresyonunu inhibe etmektedirler. İnhibin B, gelişmekte olan foliküller üzerinde parakrin etkiyle bunu gerçekleştirmektedir. İnhibin B foliküler fazda, İnhibin A ise daha çok luteal fazda salgılanmaktadır (59).

Serum inhibin B konsantrasyonu normal ovulatuvar sikluslarda FSH konsantrasyonu ile ters ilişkilidir. Foliküler fazın ortasına kadar artar, ardından progresif bir düşüş gösterir. LH pikinden sonraki kısa bir artış dışında luteal faz süresince bu düşük konsantrasyonlarda seyreder (60).

İnhibin B düzeyi ilerleyen yaş ve azalan over rezervi ile paralel olarak azalmaktadır.

**Antimüllerian Hormon (MIF):**

Antimüllerian Hormon (Müllerian İnhibing Faktör), 72 kDa ağırlığında, dimerik bir glikoproteindir. Disülfit bağlarıyla bağlanmış iki monomerden meydana gelir (61).

AMH; Transforming Growth Faktör-B ailesinin bir üyesidir ve inhibin, aktivin glikoproteinlerinin de burada yer alır (62).

Bunlar, doku büyümesi ve farklılaşmasında etkili olurlar (63).

AMH, kadında overin granüloza hücrelerinden, erkekte ise testisin sertoli hücrelerinden salgılanır. Erkek fetusun gelişiminde Müllerian kanalların gerileyip normal erkek üreme sisteminin gelişmesini sağlar. Sertoli hücrelerinde AMH sekresyonu embriyogenezis ile başlar ömür boyu sürer (62, 64).

Kadında serum AMH seviyeleri erkeğe göre daha düşüktür. AMH'nin kan değerleri 2-5 ng/ml arasındadır. Puberteden sonra menstrüel siklusla birlikte sirkülasyondaki AMH seviyeleri giderek azalır ve menopozda izlenmez (62).

AMH, klinik çalışmalarda over rezervinin değerlendirilmesinde, granuloza hücreli tümörlerin tespitinde ve takibinde, puberta prekoks ve gecikmiş pubertanın tanınmasında, kriptoorşit ve anorşit tanısında, her yaşta erkek gonad fonksiyonunun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (62, 65).

#### **Bazal over volumünün ölçülmesi (OOV)**

Sık kullanılan transvajinal ultrasonografi ile over volum ölçülmesinin kolay, ucuz, doğru olarak yapılabilmesi, over rezervini belirlemek için bu yöntemin kullanımını hızla artırmıştır (66).

Over volumü ölçümü: Overin antero-posterior, longitudinal ve transvers olarak üç plan boyutları transvajinal proba ölçülüp  $V = D1 \times D2 \times D3 \times 0.523$  elipsoid formülü ile over volümü hesaplanıp, her iki overin aritmetik ortalaması alınıp ölçülebilir (66).

Over volumü kadın hayatı süresince değişiklikler gösterir. Over volümü 10 yaşında 0, 7 cm<sup>3</sup>, 18 yaşında 5 cm<sup>3</sup>'tür. Ortalama over volumünün 35 yaş üzeri kadınlarda, 35 yaş altı kadınlara göre anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur (67).

#### **Bazal antral follikül sayımı (AFS)**

Bazal antral follikül sayımı, her iki overdeki antral foliküller (2-9mm) erken foliküler dönemde sayılarak elde edilir. IVF programlarında gonadotropinlerle ovulasyon indüksiyonuna başlamadan önce, siklus iptal oranlarını ve ovaryan cevabı tahmin etmede non-invazif ve kolay uygulanabilen bir yöntem olarak bildirilmiştir. Reuss ve ark. (68) tarafından antral follikül sayısında yaşa bağlı azalma meydana geldiği gösterilmiştir.

Bazal antral follikül sayımı <3 olan hastalarda serum FSH daha yüksek seviyede bulunmuş, Oİ için daha yüksek doz ekzojen gonadotropin verilmek zorunda kalınmasına rağmen gebelik elde edilememiştir (69).

#### **Ovarian stromal kan akımı**

Genel populasyon üç boyutlu power doppler ultrasonografi ile incelendiğinde artan yaşla birlikte overin stromal vaskülaritesinde azalma meydana geldiği gösterilmiştir (70).

### **Ovaryan Biyopsi**

Yapılan çalışmada folikül sayısı ile artan yaş arasında negatif bir korelasyon olduğu gözlenmiştir (71).

Ovaryan biopsinin over rezervi değerlendirilmesinde yeri; invazif bir işlem olması, işlemin kendisinin ileri de fertiliteye olumsuz etkisinin olabileceği ayrıca fertilitayı sağlayacak eşik follikül değerinin bilinmemesi gibi nedenlerden terkedilmiştir.

### **Klomifen Sitrat Testi (CCCT)**

Klomifen Sitrat Testi (CCCT)'de, siklusun 3. günü FSH ve E2 ölçümü yapılır, 5-9 günlerde ise klomifen sitrat 100 mg/gün uygulanır, 10. günde ölçülen FSH değerinin bazal değerlere göre artmış olması, E2 değerlerinde ise anlamlı bir artış olmaması zayıf over rezervini gösterir. 10. gün ölçülen FSH değeri  $\geq 26$  mIU/ml ise, gebelik oranı %0 'dır (72) . Normal over rezervi olan kadınlarda, klomifen sitrat tarafından indüklenen FSH artışı, foliküllerden salınan E2 ve inhibin-B tarafından sınırlandırılır. Bu test, sadece bazal FSH ölçümleri ile tanımlanamayan azalmış over rezervli kadınları ortaya çıkarır (53, 73).

### **GnRH Analöğü Stimülasyon Testi (GAST)**

Gonadotropin salgılatıcı hormon Analöğü Stimülasyon Testi (GnRH) analöğü verilmesini takiben ilk 4-6. günü içinde FSH, LH ve bunlara bağlı olarak E2 artışı meydana gelir. Siklusun 2. günü 1 mg leuprolide asetat sc uygulanarak 3. gün E2 seviyelerine bakılır (74). Buna flare etki denmektedir. Uygulama zorluğu ve pahalı bir test olmasından dolayı pratikte pek uygulanmamaktadır. Dört farklı E2 paterni izlenebilir. Hızlı E2 yükselmesi ve 4. günü azalma, gecikmiş E2 yükselmesi ve 6. gün düşme, persistan E2 yükselmesi, E2 cevabı olmaması (49).

Bu gruplarda klinik gebelik oranları oldukça farklıdır, sırasıyla % 46, % 38, %16 ve % 6 (75).

### **Gonadotropin Stimülasyonuna Cevap Testi (EFORT)**

Gonadotropin Stimülasyonuna Cevap Testi (EFORT) (Exogenous FSH Ovarian Reserve Test/ Eksojen FSH Ovaryan Rezerv Testi), IVF sikluslarında iyi ve düşük cevaplı hastaların saptanması için geliştirilen bir tarama testidir (76).

Siklusun 3. günü 300 IU FSH intramüsküler uygulanır. Önce ve 24 saat sonra E2, FSH değerlerine bakılır, artış oranları sırası ile > 25-30 pg/ml, <9 mIU/ml olursa iyi cevap olarak değerlendirilir (57).

#### **1.1.1.15. Rodentlerde Follikül Gelişiminin Kronolojisi**

Rodentlerdeki ovaryan gelişim insanlardakine benzer ancak zamanlama değişiktir. Primordiyal germ hücreleri ileri embriyonik gelişimde oogonya oluşturmak üzere gonadlara göç eder. Doğumda, rat ovaryumu kordonlardan ve oogonyalardan oluşur. Primordiyal foliküller doğumdan sonra, üçüncü günün sonunda oluşurlar (77). İlk folikül dalgasının antral foliküle kadar gelişimi üç haftayı bulur (78). İyi gelişmiş sekonder foliküller yedinci günde gözlenir. Minimal ovaryan hücre apoptozisi ancak 18. günde oluşur (77, 79). Bu dönemde erken antral foliküller gözlenir. Puberte ya da ilk östrus 34. gün civarında meydana gelir. Düzenli östrus siklusu, 10-12. aylarda düzensiz siklusların oluşumuna kadar devam eder. 12-15. ayların sonunda hayvanlar persistent siklusa girerler ve bunu persistent diöstrus ve ardından anöstrus takip eder. Folikül gelişimi 25 µm'den (primordial folikül) 500-800 µm (preovulatuvar folikül) çapa kadar, 60 günden fazla bir sürede ulaşır (yaklaşık 15 östrus siklusu). Primordiyal folikülün sekonder foliküle gelişim aşaması 30 günden uzundur. Sekonder aşamadan ovulasyona kadar olan gelişim süresi 28±2-3 gündür. Bu durumda erken folikül gelişimi, insanlardakine benzer şekilde rodentlerde de uzundur (78).

#### **1.1.1.16. Östrus Siklusu**

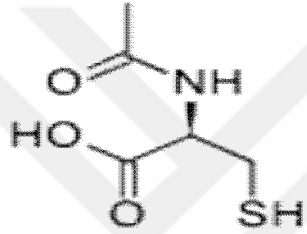
Farelerde genital siklus (östrus siklusu) post-natal 28-42. günlerde (77, 78, 80) vajinal açıklığın gözlenmesiyle, vajinal smear yöntemi kullanılarak takip edilmektedir. Östrus siklusu yaklaşık 4-5 gün sürer (80-82). Fare ve ratlarda, insanlardakine benzer olarak, genital siklus çeşitli hormonlar ile kontrol edilmektedir. Östrus siklusu, proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere başlıca 4 fazdan oluşur. Proöstrus fazı 12 saat, östrus fazı 12-24 saat, metöstrus fazı 6-8 saat, diöstrus fazı ise 52-60 saat sürmektedir (83, 84).

Östrus siklusu boyunca cinsiyet hormonlarının siklik değişimleri vajinal epitelin histolojik görünümünde belirgin değişiklikler oluşturur. İlk defa 1917'de Stockard ve Papanicolou tarafından, *guinea pig*'lerde başlayan östrus siklusu

çalışmalarından bugüne kadar, farklı memeli türlerinde östrus aşamalarını belirlemek için kabul edilen yöntem 'vajinal smear'dir (85, 86). Bu yöntem, vajinal duvardan sürüntü alınması ya da vajinal yıkama sonucu elde edilen preparatlar üzerinde, her bir faz ile bağlantılı hücre tiplerinin (epitelial hücre, kornifiye hücre, lökositler) histolojik olarak tanınması esasına dayanır. Bu yöntem canlı hayatta iken, tekrarlayan sıklara ait gözlemler için güvenilir bir kayıt sağlamaktadır. Ayrıca hayvanlarda ovulasyon zamanı, kızgınlık dönemi (davranışsal östrus) ve gebeliğin tespiti için de kullanılan pratik bir yöntemdir (83, 87-89).

### 1.2. N-Asetilsistein

Açık formülü:



Sistemik ismi: (2R)-2-acetamido-3-sülfanylpropanoic acid (90)

**Şekil 7.** N-asetilsistein kimyasal yapı formülü

N-asetilsistein'in bir GSH prekürsörü olarak bilinmesi, radikal giderici etkisinden faydalanma fikrini gündeme getirmiştir. İlk kez 1963 yılında Sheffner, mukolitik tedavi amacıyla sistein derivelerini klinikte kullanıma sunmuştur. L-sistein'in sodyum tuzu olan NAC derivasyonunun doğal sisteinden daha az irritatif olması ve göreceli olarak daha az toksik ve daha çok sülfidril grubu içermesinden dolayı klinik kullanımının daha etkili ve uygun olacağı belirtilmiştir.

#### **Farmakokinetik**

N-asetilsistein, doğal bir amino asit olan L-sisteinin N-asetillenmiş türevidir. L-sisteinin sodyum tuzu olarak hazırlanmıştır. Sistein, antioksidan etkisi olan birkaç amino asitten biridir. Asetilsistein C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>S şeklinde formüle edilebilir. Molekül ağırlığı 163.2 dir. %22 oranında suda erir. Alkol ve değişik sıvılarda da benzer oranda erime gösterir (91). NAC karaciğerde metabolize olur ve yarılanma ömrü iki ile altı saattir. Yaklaşık %20-30'u idrarla değişmeden atılır. Aktif metabolitleri disülfidler, sistein, sistin, methionin ve indirgenmiş glutatyondur (92).

### **Etki Mekanizması**

Asetilsistein mukoproteindeki disülfid bağları ile reaksiyona giren serbest sülfidril grupları içeren bir thiol bileşiktir. Sonuçta sülfidril-disülfid bağlarının yer değiştirmesi ile mukoprotein molekülleri daha küçük parçalara ayrılır ve daha az visköz birimler haline gelip infekte sekresyondaki DNA bağlarını belirgin önemli ölçüde azaltır. Mukopürülan materyal lizise uğrar ve daha az visköz hale gelmiş olur. Bu primer etki NAC'ın bir mukokinetik ajan olarak kullanımının ana nedenidir. GSH major bir serbest radikal giderici bir ajandır. Bir GSH prekürsörü olan NAC'ın serbest radikalleri detoksiye edebilme yeteneğinin anlaşılması son yıllarda bu ajanın klinik kullanımı oldukça yaygınlaştırmıştır (91). NAC, serbest radikalleri ve reaktif elektrofilleri detoksifiye eder. Reaktif elektrofiller, elektronlara afinitesi oldukça yüksek olan ve yeni radikalleri oluşturmaya hazırlanan molekül parçalarıdır. NAC ayrıca ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> düzeyini azaltır ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin toksik etkilerine karşı hücreyi korur. NAC'ın toksik radikallere karşı koruyucu etkisi, GSH biyosentezini arttırması ve GSH prekürsörü olması nedeniyledir (93). NAC alındıktan sonra hızla absorbe ve deasetile edilerek hücre içi ve hücre dışı GSH depolarına eklenir. NAC, sistein derivasyonu olarak daha az toksik ve GSH prekürsörü olabilme yeteneği en iyi olan sistein derivasyonlarına dönüşür (94).

### **Tedavide Kullanımı**

**1. Akciğer hastalıklarının tedavisinde:** NAC mukoproteindeki kimyasal disülfid bağlarını parçalayan serbest sülfidril gruplarını içermesi sayesinde sekresyonların viskozitesini azaltarak mukolitik etki gösterir. Produktif öksürükle seyreden solunumsal hastalıklarda kullanılmaktadır (91, 95). NAC verilen hastaların bronkoalveolar lavajlarında kontrol gruplarına oranla sistein ve GSH konsantrasyonlarında artış gözlenmiştir. Ayrıca bronkoalveolar lavajda serbest radikallerin artışına ve oksidatif olayların aktivasyonuna neden olan makrofaj ve nötrofillerin azalmasına neden olur. Bununla beraber lavajdaki laktoferrin ve eozinofilik katyonik proteinlerin de kemotaktik aktivitesini azaltarak etki gösterdiği düşünülmektedir (96). NAC'ın %10-20'lik solüsyonları trakeobronşial sitemde tıkaç oluşturan sekresyonları açmak için bolus şeklinde endotrakeal tüpten verilebilir. Muköz sinüs ve fistüllerin temizliğinde ve mukusla kontamine olmuş yaraların debridmanında da kullanılır. Akut ve kronik bronşit, kardiovasküler sistem

hastalıkları gibi temelinde oksidatif stresin yer aldığı hastalıklarda NAC ile tedavi edilenlerin atak şiddetleri anlamlı şekilde azalmış, ortalama hastanede yatış ve tedavi süreleri belirgin biçimde kısalmıştır (97). Serbest radikal hasarı diyafram disfonksiyonunun patogeneğinde de önemlidir. Respiratuar kas yetmezliğine sekonder gelişen ventilasyon yetersizliklerinde NAC kullanımının klinik faydalar getirebileceği vurgulanmıştır (98).

**2. Kistik fibroz ve mekonyum ileusu:** NAC içeren solüsyonlar oral yada rektal enema uygulaması şeklinde özellikle kistik fibrozlu hastaların ince bağırsaklarında meydana gelen mekonyum ileusu olgularında başarıyla uygulanmaktadır (91, 99).

**3. Septik şok:** Deneysel çalışmalarda NAC'ın hepato-splanik kan akımını arttırdığı görülmüştür. Septik şokta doğal hücre içi antioksidan olan GSH'nın azaldığı ve bunun da hücre membranlarını oksijen radikallerine karşı bir zafiyet ortaya çıkardığı saptanmıştır. Antioksidan ve sitoprodüktif etkisi olan NAC aynı zamanda endotel kökenli gevşetici faktörü stimüle edebilir ve mikrovasküler kan akımını artırabilir. Nötrofil ve trombosit agregasyonunu, pulmoner hipertansiyon ve vasküler geçirgenliği azaltabilir. Septik şokta NAC'ın oksijenizasyonu ve statik akciğer kompliyansını 24 saatte arttırdığı, bunun mortalite üzerine bir etkisinin olmadığı fakat mekanik ventilatör gereksinimini kısaltarak daha erken taburcu olmalara imkan sağladığı bulunmuştur (100).

**4. Antidot olarak kullanım:** NAC altın, kobalt ve diğer ağır metaller, karbontetraklorür, metimerkür, halotan, arsenik, asetaldehid, kumarin, interferon, bromobenzen, naftalin ve doxurubisin zehirlenmesinde de antidot olarak kullanılmaktadır (91, 99).

**5. Kardiovasküler sistem üzerine etkisi:** NAC nitratın vazodilatör etkisine olan toleransı tersine çevirerek küçük kan damarlarında direkt vazodilatör etki yapar. NAC'ın aynı zamanda pozitif inotrop ve güçlü vazodilatör etkileri vardır (101). Hepatik disfonksiyonlu hastalarda karaciğer kan akımını düzenler. Sepsisli hastalarda kardiyak fonksiyonlarda düzelleme ve gastrik pH'nın azalmasını önlediği gösterilmiştir (102).

**6. Parasetamol toksisitesi:** Yüksek dozda parasetamol alkilleyici bileşiklere dönüşüp GSH'yı baskılayarak yada karaciğer hücre membranına hasar vererek hücre nekrozuna neden olur. NAC reaktif parasetamol metabolitlerin tükettiği mitokondrial ve sitozolik GSH depolarını doldurarak etki gösterir. Zehirlenmeden saatler sonra NAC verildiğinde nötrofiller üzerindeki etkisiyle hepatik hasarın ilerlemesine karşı koyar ve mikrodolaşımın yeniden oluşmasını sağlar. Ayrıca parasetamol klirensini, sülfat konjugasyonu yan yolunu arttırmak suretiyle de etki etmektedir (103).

**7. Miyokard infarktüsü:** NAC'ın intravenöz uygulamasının miyokard infarktüsülü hastalarda trombolitik ajan olarak kullanılabilmesi ve gliseril trinitritin periferik ve koroner etkilerini potansiyelize ettiği bildirilmiştir. NAC bir tiol bileşiği olarak küçük koroner damarların dilatasyonunu artırır.

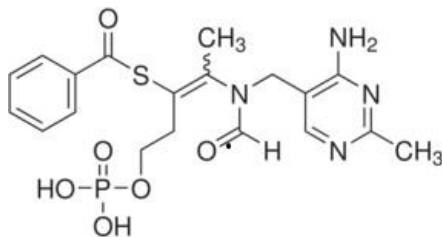
**8. Diğer klinik kullanım alanları:** Siklofosamid ile oluşan hemorajik sistitte NAC'ın tiol grupları sistide yol açan akrolenin aldehid grupları ile reaksiyona girerek toksik molekülleri nötralize eder. NAC kullanımının romatoid artrit, vaskülit ve skleroderma gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde faydalı etkileri bulunmuştur. Nefrolitiazis ve sistünürü profilaksisinde diyetle alınan sistini daha çok çözünür sistin disülfid haline getirerek yaralı etkileri gösterilmiştir (91). NAC'ın güçlü karsinogenler üzerinde farklı dozlarda farklı etkileri görülebilir. Yüksek dozlarda mutajenik metabolitlerin aktivasyonunu engeller. Bu etkisi ile karsinogenezisin değişik evrelerinde farklı karsinojen ve mutajenlere karşı koruma sağlayabilir (94).

### Yan Etkileri

N-asetilsistein'in toksisitesi son derece nadirdir. Çok ender olarak anaflaksi, taşikardi, ürtiker ve bronkospazm gibi aşırı duyarlılık reaksiyonları gelişebilir (91).

#### 1.2.3.1. Benfotiamin

Açık Formülü:



**Şekil 8.** Benfotiaminin kimyasal yapısı.

Görünüm : Beyaz  
Kimyasal Adı : S-[ (Z)-2-[ (4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl) methylformylamino]-5-phosphonooxypent-2-en-3-yl] benzenecarbothioate.  
Moleküler ağırlığı : 466, 45 g/mol Cas No: 22457-89-2  
Ticari adları : S-Benzoylthiamine O-monophosphate (Sigma Chemica Co. St.Louis, MO.A.B.D.) (18)

Suda çözülebilen bir vitamin olan tiamin bakliyat, hububat, kuru fasulyede, fındıkta, ekmekte, soyada, yağsız ette ve balıkta bulunur. Hücresel enerji metabolizmasında karbonhidratların enerjiye dönüştürülme sürecine tiamin, yardımcı olarak önemli bir rol oynar. Tiamin; kalbin, kasların ve sinirlerin normal durumda çalışması için gereklidir ve farklı metabolik bozuklukların tedavisi için faydalıdır (104, 105).

Allitiamin olarak isimlendirilen tiaminden türemiş bileşimler; Allium genusdaki taze soğan, soğan ve pırasa gibi bitkilerde bulunmuştur (106).

Tiamin kökenli birleşimlerin eşsiz kaynaklarından biri olan Benfotiamin, allitiamin olarak isimlendirilen, soğan, taze soğan, kızarmış veya ezilmiş sarımsakta ve pırasa gibi sebzelerde eser miktarda bulunur (18).

Yağda-çözülebilen bir tiamin türü olan Benfotiamin; S-Benzoylthiamine-0-mono fosfat olarak tanınan eşsiz açık tiyazol-halkalı bir yapıya sahiptir ki bu yapı onun doğrudan bağırsak duvarını geçebilmesini ve kolaylıkla hücre membranına ve hücre içine geçmesini sağlar. Benfotiamin, bu yapı nedeniyle S-acyl tiamin grubunun türevi olarak da tanımlanmıştır (107, 108). Benfotiamin; başka bir tanıma göre B1 vitamininin yağda eriyen türüdür. Normal suda çözülebilen B1 vitaminine tiamin, özel yağda çözülebilen B1 vitaminine ise benfotiamin denilir (18). Benfotiamin transketolaz aktivitesinde artışa neden olarak pentoz fosfat yolunu aktive eder. Bu yolağın aktive olmasıyla vasküler hasara oluşumuna neden sayılan heksosamin yolağı, hücre içi AGE oluşum yolu ve DAG/Protein kinaz C yollarının etkilerinin azalmasına sebebiyet verir (16).

Hayvan deneylerinde uygulanan yüksek doz tiamin ve benfotiamin kullanımının, hayvanlarda transketolaz aktivitesinde artışa ve bununla birlikte albuminüri düzeyinde azalmaya neden olmuştur (17).

Yapısı nedeniyle hakiki tiamine göre benfotiamin; çok daha yüksek bir biyoelverişliliğe sahiptir. Bu özelliğiyle benfotiaminin, suda-çözülebilir tiamine göre vücutta daha kolay absorbe edildiği ve oral uygulamada eşdeğer bir tiamin dozuna göre en az beş kat daha yüksek tiamin-plazma konsantrasyonuna yani suda çözülebilir tiamine göre beş kat daha yüksek plazma düzeylerine ulaşabilme etkinliğine sahip olduğu bildirilmiştir (109-112). Bundan ötürü diğer yağda çözülebilir ya da allitiamin ailesindeki lipid tiamin türevlerine göre daha iyi olduğu ve lipitte çözülebilir türdeşleri içerisinde en güçlüsü olduğu belirtilmiştir (109).

Benfotiaminin oral uygulamasıyla tiamin, tiamin mono fosfat ve tiamin difosfat düzeylerinin kanda ve karaciğerde önemli bir ölçüde arttığı fakat beyinde oluşmadığı görülmüştür. Tiamin eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan akut periferik sendromunun tedavisi için, benfotiaminin daha iyi bir absorpsiyon kapasitesinin olması nedeni ile daha faydalı olabileceği bildirilmiştir (113, 114).

Reaktif oksijen türleri üzerine de benfotiaminin inhibe edici etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (115, 116).

Benfotiaminin insan endotel hücrelerinde ilerlemiş glikasyon son ürünlerin (Advanced Glycation Endproduct, AGE) artışını engellediği görülmüştür (117). Yüksek glikoz hasarlarında benfotiamin koruyucu etkiye sahiptir (118). Hücrede çevresel oksidan ajanların etkisini kendi üzerine çeken redükte glutatyon (GSH), antioksidan gibi davranarak hücrenin fonksiyonel proteinlerini okside olmaktan korur. Bu arada glutatyonun kendisi oksitlenir (GSSG). Bu okside glutatyonun fonksiyonunu yapabilmesi NADPH ile tekrar redükte hale gelmesi ile mümkündür. Pentoz fosfat yolu NADPH için önemli bir kaynaktır ve tiamin de bu yolu aktive edici olduğundan dolaylı bir antioksidan olarak kabul edilmiştir (119-121).

Yüksek glikoz maruziyetinden dolayı endotel hücrelerde ve perisitlerde meydana gelen apoptozisin iki göstergesi olan deoksiribonükleik asit (DNA) fragmentasyonu artışı ve Caspase 3 aktivitesi benfotiamin tarafından engellenebilir (122).

Ayrıca diyabetik nefropati, diyabetik nöropatiye bağlı ağrıların giderilmesinde ve diyabetik kardiyomyopati üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir

(123, 124). Benfotiaminin Tip 2 diyabetik sıçan böbreklerinde fosfodiesteraz 5 ve izoformlarının ekspresyonu üzerine etkisi incelenmiştir(125).

Bir başka çalışmada da benfotiaminin diyabetli sıçanlardaki endotel hücrelerde fazla sayıda üretilmiş reaktif oksijen türlerini normalleştirdiği gösterilmişken (126), bir diğer çalışmada streptozotocin (STZ) indüklemeli diyabetik farelerde de oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir(127).

Benfotiaminin insan perisit apoptozisinin engellenmesinde, faredeki anjiyogenesis ve sonraki apoptozisin engellenmesinde, streptozotosin-bağlı deneysel şeker hastalığı olan kardiyomyosit kontraktıl disfonksiyonun engellenmesinde, ilerlemiş titreşim persepsiyonda, motor fonksiyon ve alkolik polinöropatinin tüm sebeplerinin azaltılmasında, iskemik diabetik kol ve bacakların iyileşmesinin hızlandırılmasında, endotoksine bağlı üveitin, makro/mikrovasküler endotelyal disfonksiyon gibi patolojik durumların gelişmesinin önlenmesinde çok yönlü terapötik potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (128-134). Spermde tiaminin varlığına ve erkeğe özgü infertilite, spermatogenezis, sıçan testisleri, Sertoli ve Leydig hücreleri üzerine etkilerine yönelik çalışmalar yapılmıştır (135-138).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) laboratuvarında yapılmıştır. Tüm işlemler Fırat Üniversitesi Etik onayı ile veteriner hekim kontrolünde gerçekleştirilmiştir.

Sunulan çalışmada 28 adet düzenli siklusa sahip, ağırlıkları 200-220 gr arasında değişen 12-14 haftalık Wistar Albino cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Ratlar 12 saat ışık (08–22), 12 saat karanlık fotoperiyodunda ve 21–23 C° sabit sıcaklıktaki odada beşerli kafeslerde tutuldu, standart pellet yemi ve şehir suyu ile beslendi. Deneyden 18 saat önce oral beslenme kesilerek, sadece su içmelerine izin verildi. Ratların beslenmesinde kullanılan yemin bileşimi Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1.** Standart rat yemi

Yem Bileşimi	
Su (en çok)	% 12
Ham protein (en az)	% 24
Ham selüloz (en çok)	% 7
Ham kül (en çok)	% 8
HCl’de çözünmeyen kül (en çok)	% 2
NaCl (en çok)	% 1
Mineral Karması*	% 1.25
Vitamin Karması**	%1.25
Metabolik enerji	2650 kcal/kg

\*Mineral Karması: Kalsiyum (% 1.0-2.8), Fosfor (% 0.9), Sodyum (%0.5-0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg).

\*\*Vitamin Karması: Vitamin A (300 IU/kg), Vit. D<sub>3</sub> (1000 IU/kg), Vit. E (60 mg/kg), Vit. B<sub>2</sub> (4 mg/kg).

### 2.2. Deneyin Yapılışı

Çalışma, deney hayvanlarının seçimi esnasında ve yapılan uygulamalar sırasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu (16.12.2015 tarih, Toplantı Sayısı: 2015/22, Karar No: 202) onayı alınarak Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi’nde (FÜDAM) standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yürütüldü.

Araştırmamızda 28 adet düzenli siklusa sahip, ağırlıkları 200-220 gr arasında değişen 12-14 haftalık Wistar Albino cinsi dişi sıçanlar her grupta 7 hayvan olacak şekilde, estrus fazında rastgele, prospektif, tek kör olarak 4 gruba ayrıldı.

**Grup I (Kontrol grubu);** Batın açılıp, over gözlendi ve batın kapatıldı.

**Grup II (Transplantasyon grubu);** Batın açılıp, bilateral ooferektomiye takiben, overler yağ dokusundan temizlendi, 2 eşit parçaya ayrıldı ve hemen her iki uterin hornun yanındaki vasküler pleksus yakınına mikrocerrahi teknik kullanılarak 5/0 vikril ile dikildi ve batın kapatıldı.

**Grup III (Transplantasyon + Benfotiamin grubu);** Batın açılıp, bilateral ooferektomiye takiben, overler yağ dokusundan temizlendi, 2 eşit parçaya ayrıldı ve hemen her iki uterin hornun yanındaki vasküler pleksus yakınına mikrocerrahi teknik kullanılarak 5/0 vikril ile dikildi ve batın kapatıldı. Cerrahiden 1 gün önce ve transplantasyondan sonra 3 hafta boyunca benfotiamin 70 mg/kg/gün dozunda oral olarak verildi.

**Grup IV (Transplantasyon + N-asetilsistein grubu);** Batın açılıp, bilateral ooferektomiye takiben, overler yağ dokusundan temizlendi, 2 eşit parçaya ayrıldı ve hemen her iki uterin hornun yanındaki vasküler pleksus yakınına mikrocerrahi teknik kullanılarak 5/0 vikril ile dikildi ve batın kapatıldı. Cerrahiden 1 gün önce ve transplantasyondan sonra 7 gün boyunca NAC 150 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal verildi.

Deney süresi sonunda tüm gruptaki sıçanlar ketamin (75mg/kg) + xylazine (10mg/kg) intraperitoneal (i.p) uygulanarak anestezi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından sıçanların over dokuları hızla çıkarılıp uygun fiksatiflerle tespit edilip ardından histolojik takip serilerinden geçirilip parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan 4-6 µm kalınlığındaki doku kesitlerine Masson-Trikrom boyası yapılarak gruplar arası histopatolojik farklılıklar incelendi. Ayrıca bu kesitlere TUNEL tekniği uygulanarak apoptotik hücreler tespit edildi. Bununla birlikte over dokularında TAS ve TOS seviyelerine bakılacağından dokular çalışma gününe kadar -80 °C’de saklandı.

### **2.1. TAS Düzeylerinin Ölçümü**

Toplam Antioksidan düzeyleri Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda otoanalizörle (Siemens Advia 2400 ChemistrySystem, Siemens, Tokyo, Japonya) Rel Assay Total Antioxidant Status Test Kiti kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar mmol TroloxEquiv./L olarak belirtildi. Kitin lineeritesi 0-2, 75 mmol TroloxEquiv./L, ölçüm aralığı ise 1, 20-1, 50 mmol/L idi. Over doku TAS sonuçları dilüsyon katsayısı ile çarpılarak hesaplandı.

### **2.2. TOS Düzeylerinin Ölçümü**

Toplam Oksidan durum düzeyler (TOS) düzeyleri Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda otoanalizörle (Siemens Advia 2400 Chemistry System, Siemens, Tokyo, Japonya) RelAssay Total Oxidant Status Test Kiti kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equiv./L olarak belirtildi. Kitin lineeritesi 0-33, 52, 75  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equiv./L, ölçüm aralığı ise 4-6  $\mu\text{mol/L}$  idi. Over doku TOS sonuçları dilüsyon katsayısı ile çarpılarak hesaplandı.

### **2.3. TUNEL Metodu**

Parafin bloklardan 5-6  $\mu\text{m}$  kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. 0.05% 'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37° C' de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70  $\mu\text{l}$  Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/Wash Buffer da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Perosidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi. Harris hematoksilen ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal,

kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 1).

**Tablo 2.** TUNEL Boyama Prosedürü.

İşlem	Süre
1 60°C etüv	Bir gece
2 Xylol	3X15 dakika
3 %100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4 PBS	5 dakika
5 Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	.....
6 1: 500 d ilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7 PBS	3X5 dakika
8 Endojen peroksit blokajı (% 3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3 dakika
9 PBS	3X5 dakika
10 Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11 Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C' de	60 dakika
12 Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13 Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14 PBS	3X5 dakika
15 DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16 PBS	3X5 dakika
17 Distile su	5 dakika
18 Harris hematoksilen	1-5 dakika
19 Distile su	5 dakika
20 %80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21 Xylol	2X5 dakika
22 Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kapatma.	.....

### 2.3. Histolojik Çalışma

Her gruptan alınan over dokuları, % 10'luk formaldehit tespit solüsyonunda 24 saat süresince tespit edildikten sonra musluk suyu altında yıkamaya alındı. Musluk suyunda 24 saat yıkanan dokular daha sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirildi (Tablo 2). Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklardan 4–6 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere Masson Trikrom boyası ile boyandı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskobunda incelenip

fotoğraflandı. Değişiklikler, histopatolojik durumlarına göre yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak değerlendirildi. Her bir sıçan için skorlama yapıldı ve her grup için ortalama değerler saptandı. Over rezervi hesaplanmasında Mzaud ve ark. larının yöntemine göre over folikülleri tanındı.

**Tablo 3.** Histolojik takip serileri

Sıra	İşlem	Süresi
1	%70 Alkol	2 saat
2	%80 Alkol	1, 5 saat
3	%96 Alkol I	30 dakika
4	%96 Alkol II	30 dakika
5	%100 Alkol I	30 dakika
6	%100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	15 dakika
9	Xylol II	15 dakika
10	Yumuşak parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 saat
12	Yumuşak parafin + Sert parafin	1, 5 saat
13	Sert parafin	3 saat
14	Gömme	

#### 2.4. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak belirlendi. İstatistiksel analiz için SPSS version 22 programı kullanıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve posthoc tukey testi ile yapıldı.  $p < 0.05$  değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. TAS-TOS Düzeyi Sonuçları

Over dokularında TAS düzeyleri ölçüldü. Kontrol grubu ile kıyaslandığında transplantasyon grubunda TAS değerleri anlamlı olarak azalmıştı. Transplantasyon grubu ile kıyaslandığında transplantasyon+benfotiamin grubunda TAS değerlerinde artış gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bununla birlikte transplantasyon+NAC grubunda transplantasyon grubuna göre istatistiksel olarak belirgin bir artış vardı ve kontrol grubuna yakın izlendi. Transplantasyon+benfotiamin grubu ve transplantasyon+NAC grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

Over dokusunda TOS düzeyleri ölçüldü. Kontrol grubu ile kıyaslandığında transplantasyon grubunda istatistiksel olarak belirgin bir artış vardı. Transplantasyon grubu ile kıyaslandığında ise transplantasyon+benfotiamin grubunda ve transplantasyon+NAC grubunda belirgin bir azalma izlendi. Transplantasyon+benfotiamin grubu ile transplantasyon+NAC grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim izlenmedi.

**Tablo 4.** TAS-TOS Düzeyi Sonuçları

	TAS ( $\mu\text{mol/L}$ )	TOS ( $\mu\text{mol/L}$ )
<b>KONTROL</b>	309.16 $\pm$ 8.88	170.50 $\pm$ 20.38
<b>TRANSPLANTASYON</b>	225.33 $\pm$ 61.42 <sup>a</sup>	317.33 $\pm$ 28.76 <sup>a</sup>
<b>TRANSPLANTASYON+BENFOTİAMİN</b>	296.33 $\pm$ 17.73	207.83 $\pm$ 43.46 <sup>b</sup>
<b>TRANSPLANTASYON+NAC</b>	321.16 $\pm$ 11.66 <sup>b</sup>	254.66 $\pm$ 51.86 <sup>b</sup>

Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> Transplantasyon grubuna göre karşılaştırıldığında, ( $p < 0.05$ ).

#### 3.2. TUNEL Bulgular

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği tüm gruplarda over dokusunda lüteal hücrelerde (kırmızı ok) gözlemlendi.

Over dokusunda TUNEL pozitifliği, kontrol grubu (Şekil 9) ile kıyaslandığında transplantasyon grubunda (Şekil 10) belirgin olmak üzere transplantasyon+NAC ve transplantasyon+benfotiamin grubunda (Şekil 11) anlamlı

bir artış vardı ( $p<0.05$ ). Transplantasyon grubu ile kıyaslandığında ise transplantasyon+benfotiamin grubu ve transplantasyon+NAC grubunda (Şekil 12) TUNEL pozitifliğinde anlamlı bir azalma vardı. Transplantasyon+benfotiamin grubu ile transplantasyon+NAC grubu ile kıyaslandığında transplantasyon+NAC grubunda TUNEL pozitifliğinde anlamlı bir azalma vardı.

TUNEL pozitif kontrol dokusu olarak meme dokusu kullanıldı (Şekil 13, Tablo 5).

**Tablo 5.** Apoptotik indeks (%)

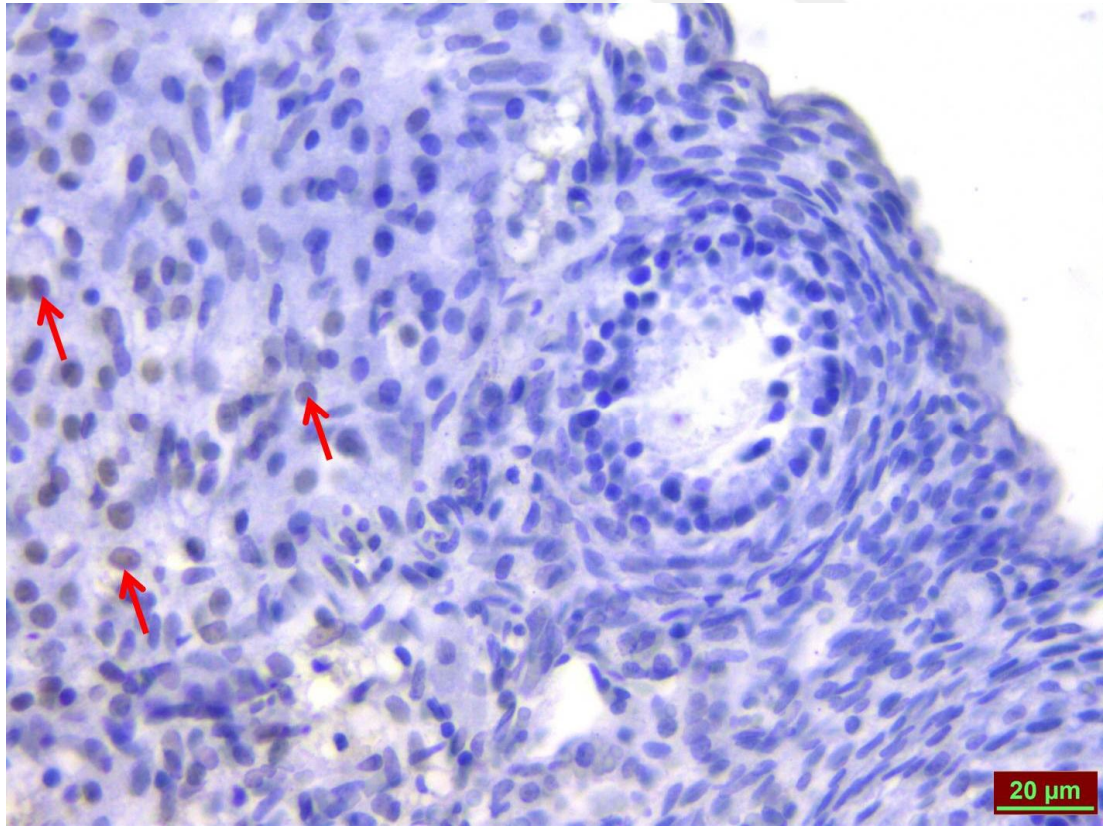
	Apoptotik İndeks (%)
<b>KONTROL</b>	12.16±1.94
<b>TRANSPLANTASYON</b>	34.33±4.45 <sup>a</sup>
<b>TRANSPLANTASYON+BENFOTİAMİN</b>	23.16±3.31 <sup>ab</sup>
<b>TRANSPLANTASYON+NAC</b>	12.83±2.63 <sup>bc</sup>

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

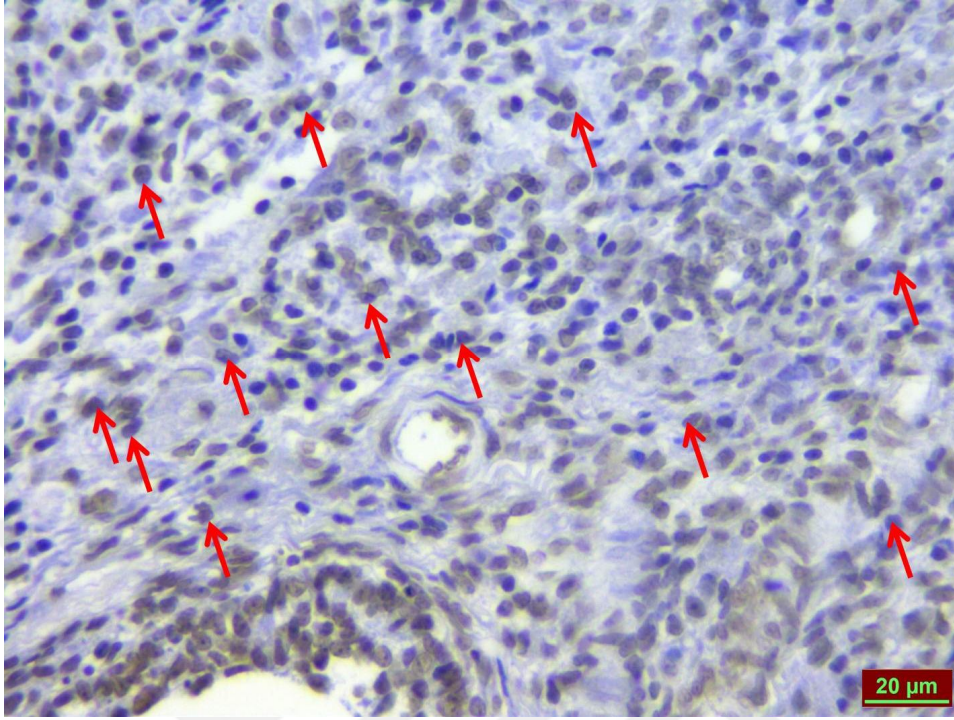
<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> Transplantasyon grubuna göre karşılaştırıldığında,

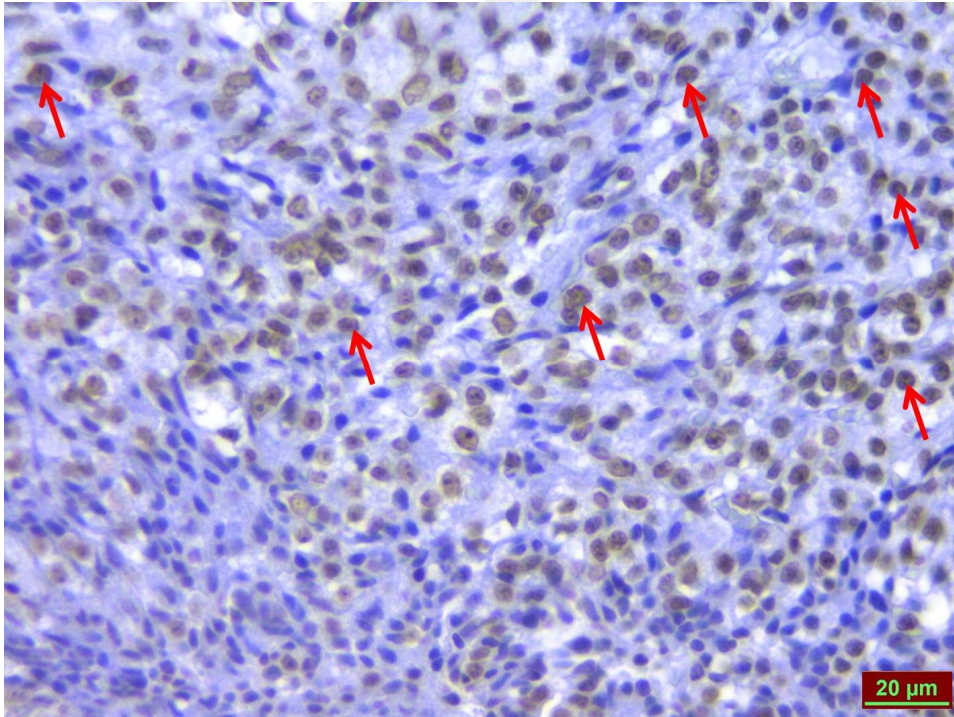
<sup>c</sup> Transplantasyon+Benfotiamin grubuna göre karşılaştırıldığında ( $p<0.05$ ).



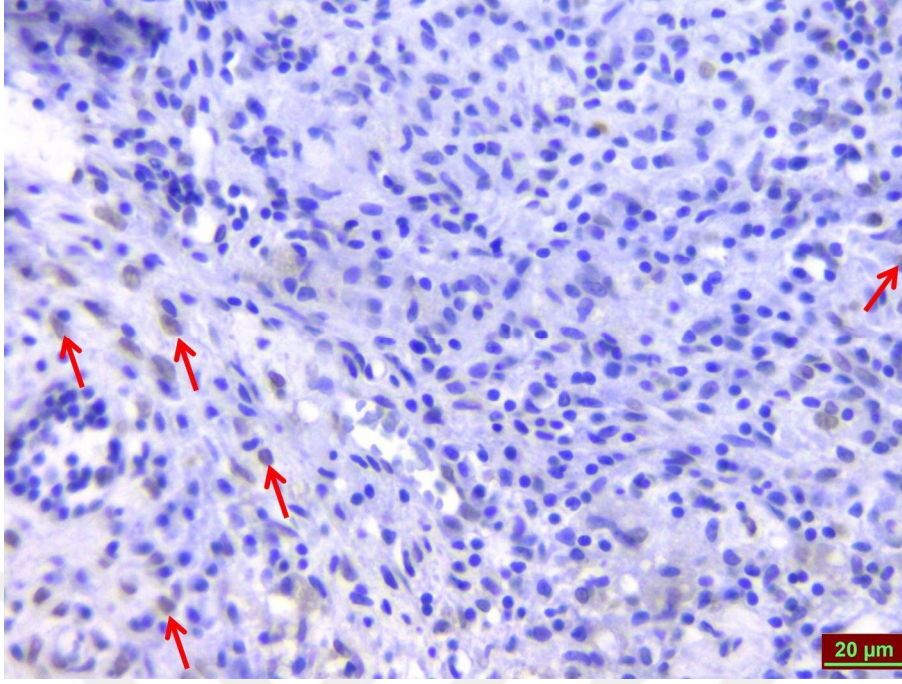
**Şekil 9.** Kontrol grubu over dokusu TUNEL pozitif hücreler (kırmızı ok).



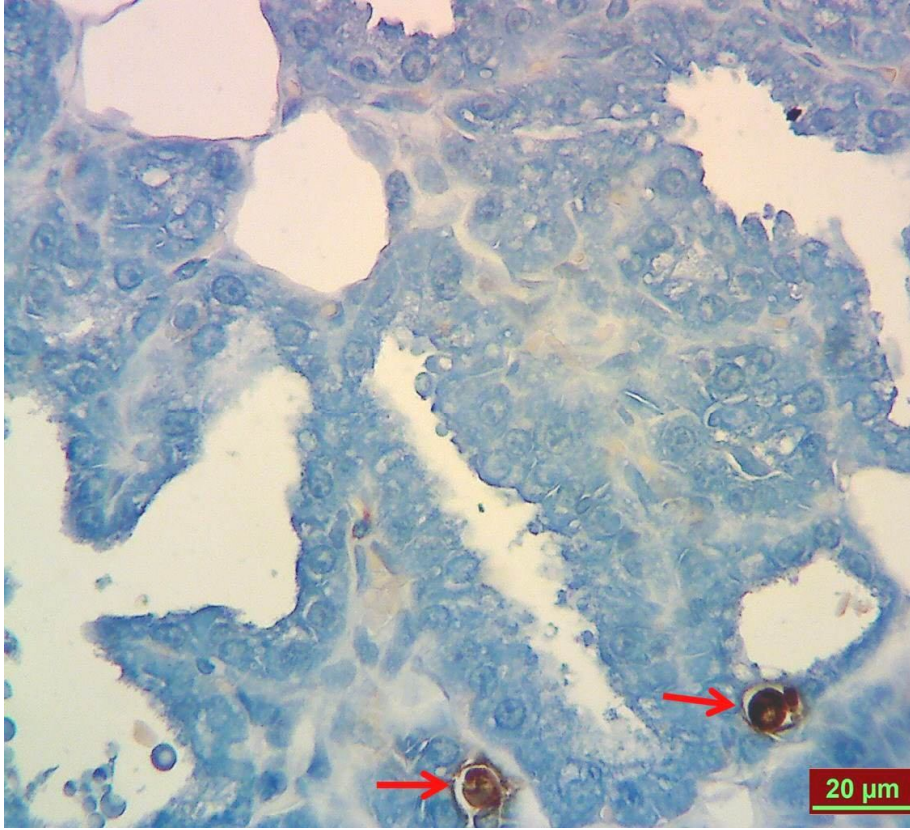
Şekil 10. Transplantasyon grubu over dokusu TUNEL pozitif hücreler (kırmızı ok).



Şekil 11. Transplantasyon+Benfotiamin grubu over dokusu TUNEL pozitif hücreler (kırmızı ok).



**Şekil 12.** Transplantasyon+NAC grubu over dokusu TUNEL pozitif hücreler (kırmızı ok).



**Şekil 13.** Pozitif kontrol. Meme dokusu TUNEL pozitif hücreler (kırmızı ok).

### 3.3. Histolojik Bulgular

Over dokusunun Masson's trichrome ve Hematoksilen-Eozin boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; Kontrol grubu (Şekil 14, 18) ile diğer gruplar karşılaştırıldığında primer-sekonder folikül, corpus luteumda anlamlı fark yoktu. Primordial folikül tüm gruplarda azalmıştı, transplantasyon+benfotiamin grubu ile transplantasyon+NAC grubu arasında anlamlı bir fark yoktu.

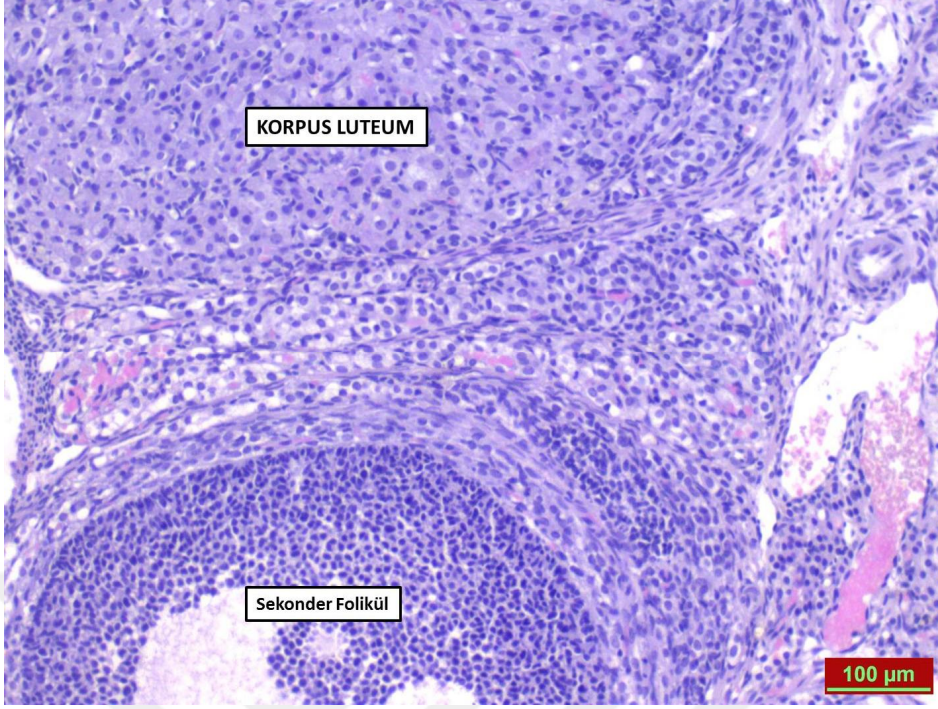
Fibrozis açısından değerlendirildiğinde; kontrol grubu ile kıyaslandığında transplantasyon grubunda anlamlı bir artış izlendi, transplantasyon grubu ile kıyaslandığında ise transplantasyon+benfotiamin ve transplantasyon+NAC grubunda anlamlı bir azalma izlendi.

Nekroz açısından değerlendirildiğine ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında transplantasyon grubunda belirgin nekroz (Şekil 15) ve PML (Şekil 15) vardı. Transplantasyon grubuyla karşılaştırıldığında ise transplantasyon + benfotiamin grubunda PML azalmıştı, nekroz izlenmedi. Transplantasyon + NAC grubunda ise nekroz izlenmezken PML artışı yerine kronik iltihabi hücrelere (Şkil 17) bırakmıştı.

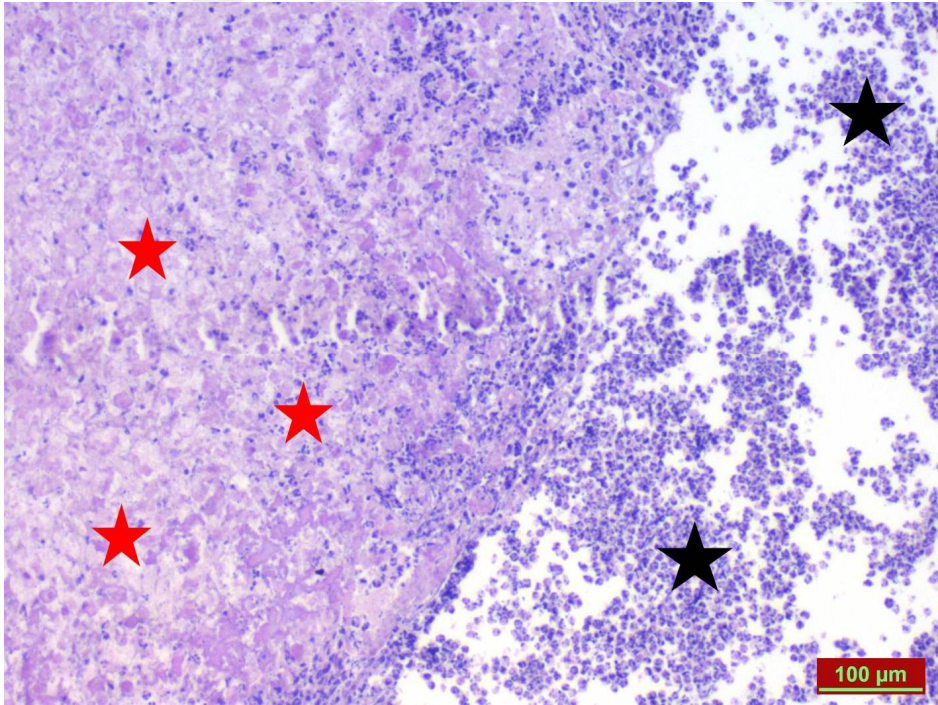
**Tablo 6.** Over dokusunun Masson's trichrome ile boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi

	Primer folikül	Sekonder folikül	Primordial folikül	Corpus luteum
<b>KONTROL</b>	5, 20±2, 28	13, 33±5, 60	10, 40±4, 77	22, 80±10, 73
<b>TRANSPLANTASYON</b>	4, 00±0, 00	11, 00±4, 76	0, 80±1, 78	23, 50±3, 00
<b>TRANSPLANTASYON +BENFOTİAMİN</b>	4, 00±2, 82	14, 80±9, 01	0, 66±1, 15	22, 00±10, 29
<b>TRANSPLANTASYON +NAC</b>	7, 50±4, 12	14, 00±2, 44	2, 66±1, 15	19, 20±3, 63

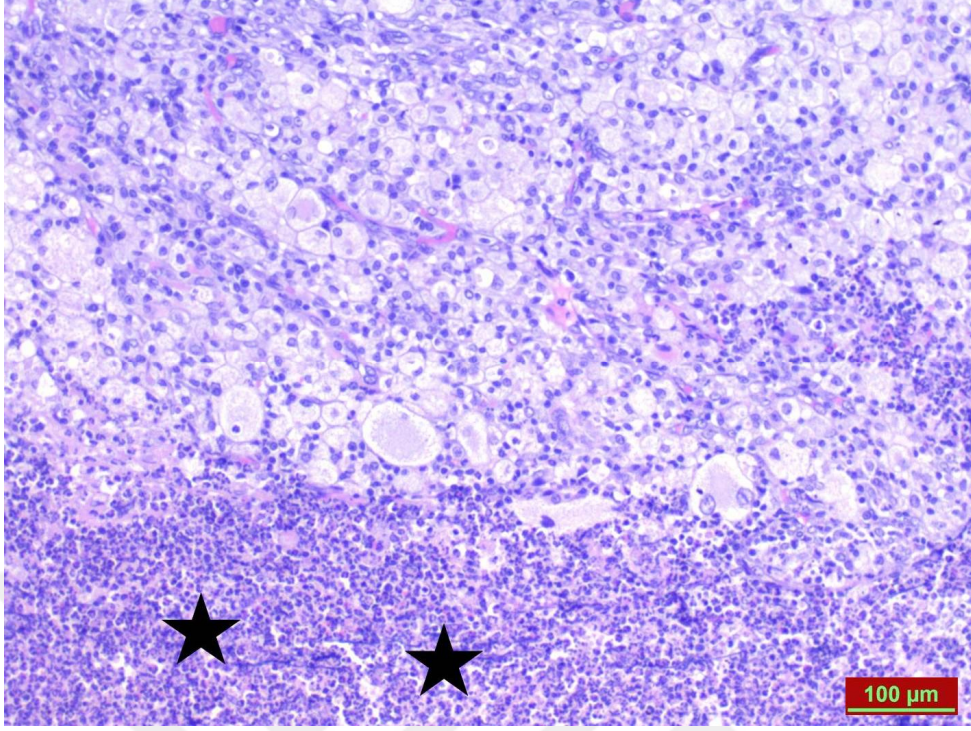
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



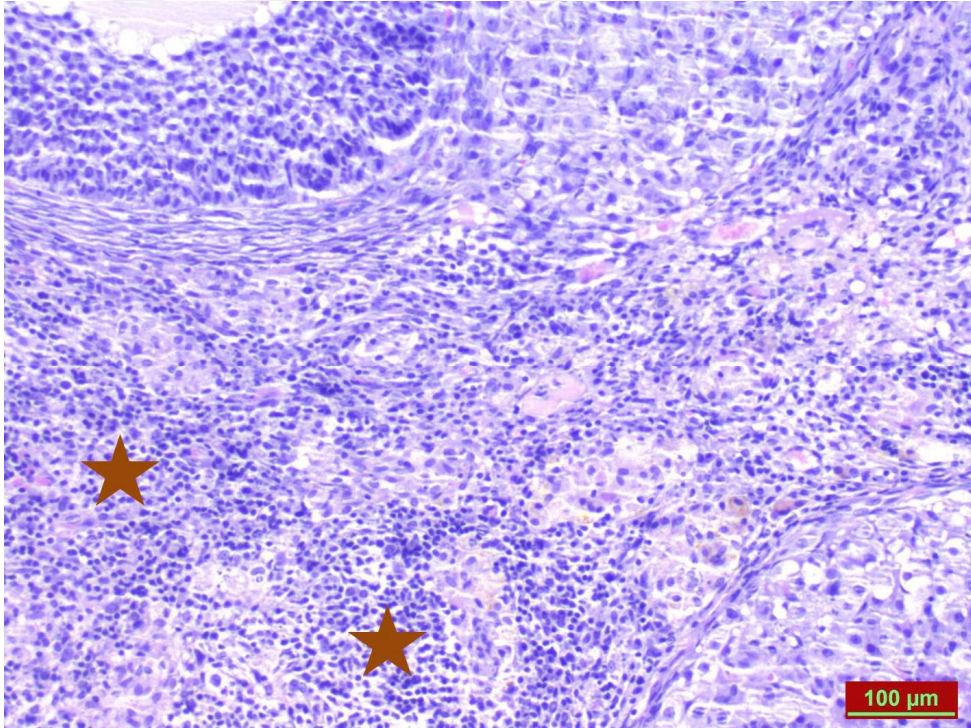
Şekil 14. Kontrol grubuna ait normal görünümlü over dokusu.



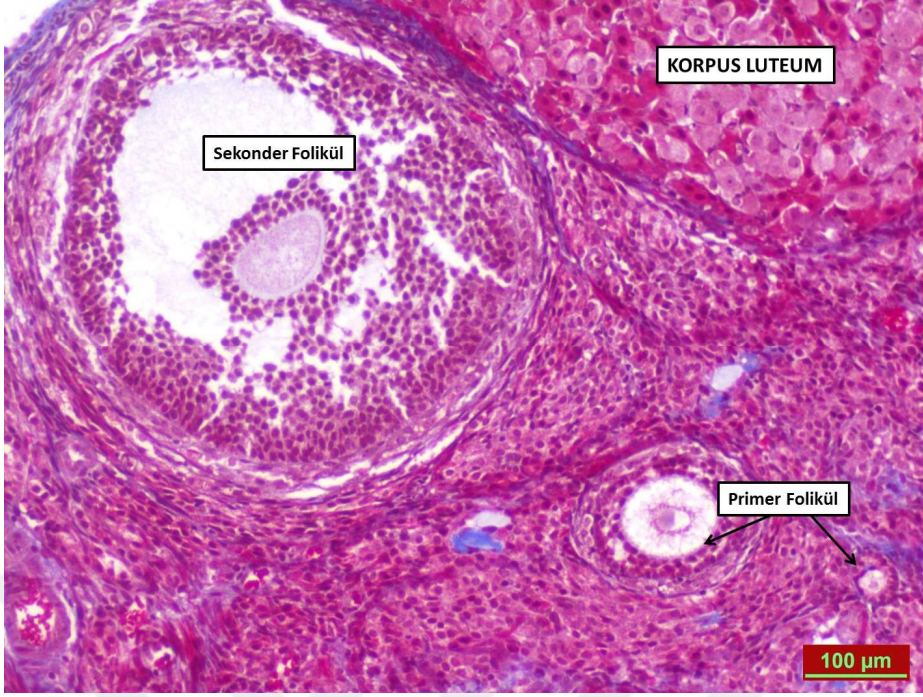
Şekil 15. Transplantasyon grubuna ait over dokusu. (Kırmızı yıldız: Nekroz, Siyah Yıldız PNL artışı)



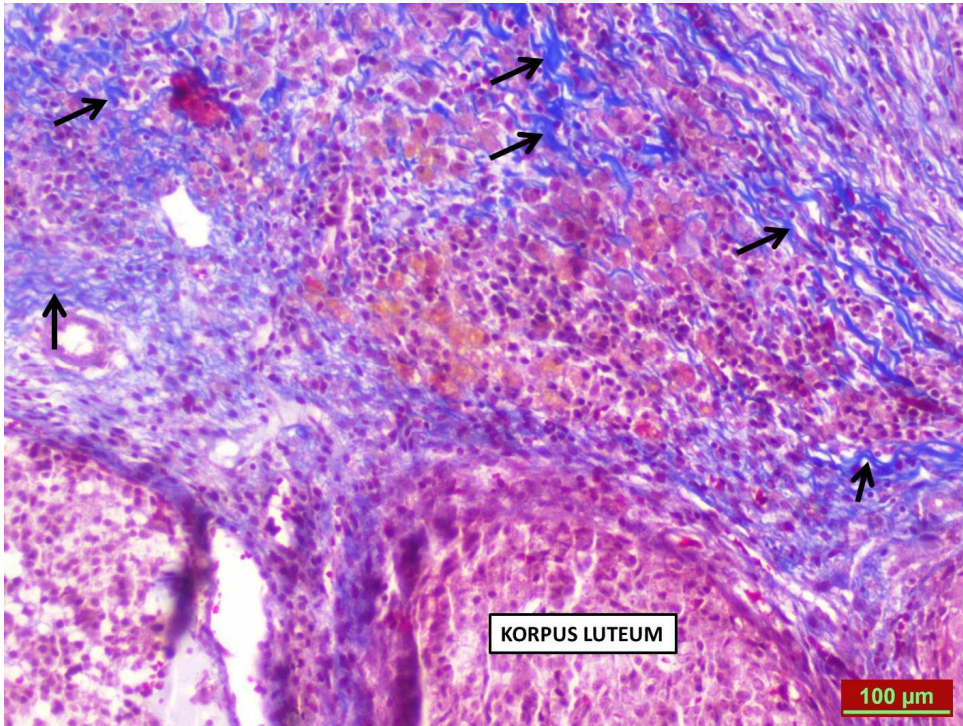
**Şekil 16.** Transplantasyon + Benfotiamin grubuna ait over dokusu. (Siyah Yıldız PNL artışı)



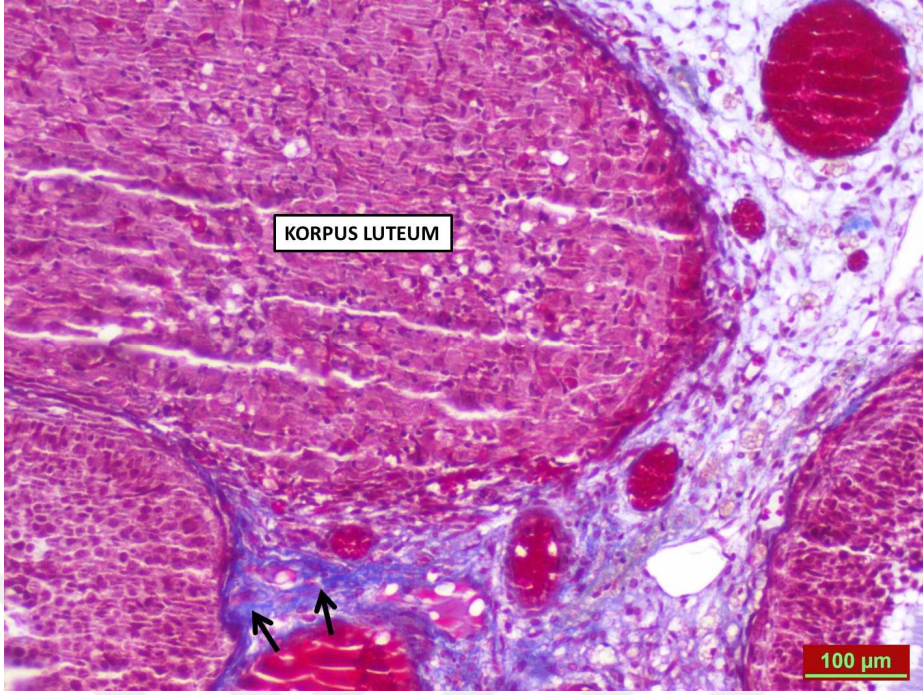
**Şekil 17.** Transplantasyon + NAC grubuna ait over dokusu. (Kahverengi yıldız: kronik iltihabi (lenfomonositik) hücreler)



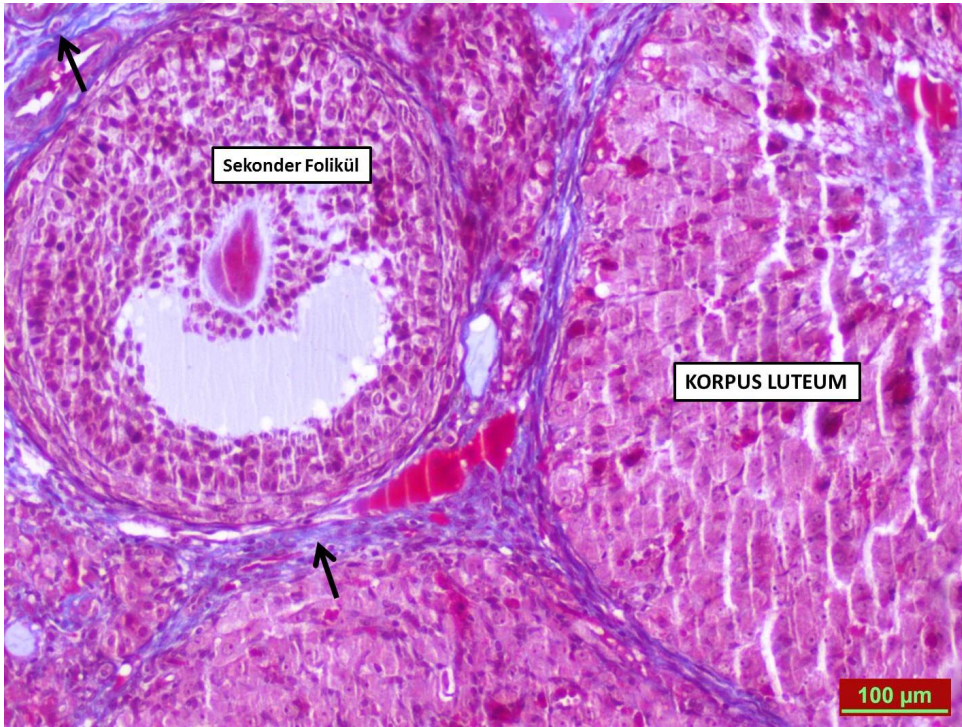
Şekil 18. Kontrol grubuna ait normal görünümlü over dokusu.



Şekil 19. Transplantasyon grubuna ait over dokusu. (Siyah ok: Fibrozis)



Şekil 20. Transplantasyon+Benfotiamin grubuna ait over dokusu. (Siyah ok: Fibrozis)



Şekil 21. Transplantasyon+NAC grubuna ait over dokusu. (Siyah ok: Fibrozis)

#### 4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, otolog intraperitoneal over transplantasyonu sonrası over dokusu üzerinde NAC ve benfotiamin doku koruyucu etkileri incelendi.

Hem cerrahi hem de örneğin ektopik gebelikte kullanılan bazı medikal metodlar germinal hücre proliferasyonunun bozulması veya overe olan kan desteğinin azalması yoluyla ovaryan rezervi olumsuz etkilemektedir (139-141). Biz de ovaryan ototransplantasyon yaparak ovaryan kan desteğini bozmuş olduk.

Oksijen-ilişkili serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu tarafından indüklenen iskemi reperfüzyon hasarının primordiyal folikül kaybına neden olduğu gösterilmiştir (142). Atılğan ve ark. (141) ise unilateral total salpenjektomi yaptıkları deneysel bir çalışmada sekonder folikül sayısının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını tespit etmişlerdir. Primordial, primer ve tersiyer folikül sayısında ise anlamlı bir fark bulamamışlardır. Paşa ve ark. (143) ise yaptıkları total salpenjektomi deneyinde primer, primordial, tersiyer ve sekonder folikül sayılarının tümünün kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Bizim deneyimizin sonucunda ise transplantasyon yaptığımız grupta primordial folikül sayısını kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını tespit ettik. Korpus luteum, primer, sekonder, tersiyer folikül ve korpus luteum sayılarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık. Bizim bulgularımız Atılğan ve ark. (141) ile Paşa ve ark. (143) 'nın bulguları ile kısmen uyuşmaktadır. Bunun nedeni Paşa ve ark. (143) deneylerinde 5-6 haftalık wistar albino cinsi rat kullanmışken, Atılğan ve ark. (141) bizim çalışmamızda da kullandığımız gibi ratlar 12-14 haftalık Wistar Albino cinsi ratlar idi. Zira rat yaşı arttıkça over fonksiyonları da olumsuz olarak etkilenmektedir (144). Bu farklılığın nedeni rat yaşlarının aynı olmaması olabilir. Ayrıca ovaryan doku transplantasyon deneysel çalışmalarında folikül dansitesinde %50-%90 civarında bir azalmanın olduğu gösterilmiştir (145, 146). İstenmeyen folikül aktivasyonu (foliküllerde sayıca artış) (147, 148) ve oosit ve foliküllerde asenkronize büyüme tespit edilmiştir (149). Bizim folikül sayısındaki farklı bulgumuz, özellikle primordiyal foliküllerin çok fazla azalmasına karşın diğer folikül sayıları ve korpus luteum sayıları ile ileri derecede diskordans göstermektedir. Yukarıdaki tespitler bizim folikül sayımızdaki diğer çalışmalarla olan farklılığımızı açıklayabilir. Bu konuyu daha iyi irdeleyebilmek için bazı bilgilerin gözden

geçirilmesi gerekmektedir. Over stroması kollajen, kontraktıl ve interstisyel hücreler içerir (150). Kan veya lenfatik sirkülasyon bozukluğunda kollajen neformasyonu sitimüle olur (151). Uterin ve tubal lenfatikler broad ligamentde birbirlerine çok yakın seyredeler (152). Ovaryan transplantasyon esnasında lenfatik sirkülasyonda hasar meydana gelir. Bu da kollajen formasyonunda artışa neden olabilir. Fibrozisdeki artış, over folikül rezervindeki azalmayı telafi eden kompensatuar bir mekanizma olabilir (151). Sekonder, primer ve tersiyer folikül sayıları ile korpus luteum sayılarının tüm gruplarda benzer olması bu teoriyi desteklemektedir. Bu yönüyle bizim bulgularımız da uyumludur. Aynı şekilde rodentlerdeki foliküler gelişimin kısaca gözden geçirilmesi konuyu anlamamızda faydalı olacaktır. Rodentlerde primordiyal foliküller doğumdan sonraki üçüncü günün sonunda oluşurlar (153). İlk folikül dalgasının antral foliküle kadar gelişimi üç haftayı bulur (154). İyi gelişmiş sekonder foliküller yedinci günde gözlenir. Minimal ovaryan hücre apoptozisi ancak 18. günde oluşur (153, 155). Bu dönemde erken antral foliküller de gözlenir. Puberte ya da ilk östrus 34. gün civarında meydana gelir. Düzenli östrus siklusu, 10-12. aylarda uzayan ve düzensiz siklusların oluşumuna kadar devam eder. 12-15. ayların sonunda hayvanlar persistent siklusa girerler ve bunu persistent diöstrus ve ardından anöstrus takip eder. Folikül gelişimi 25 µm'den (primordial folikül) 500-800 µm (preovulatar folikül) çapa kadar, 60 günden fazla bir sürede ulaşır (yaklaşık 15 östrus siklusu). Primordiyal folikülün sekonder foliküle gelişim aşaması 30 günden uzun olabilir. Sekonder aşamadan ovulasyona kadar olan gelişim süresi 28±2-3 gün olabilir (154). Bu bilgiler ışığında değerlendirirsek, belki biraz daha uzun bir süre sonra (2 ay) ratların overleri incelense idi gruplar arasında folikül sayıları bakımından anlamlı farklılıklar bulabilirdik. Ancak burada da ratların yaşlanmasına bağlı ovaryan foliküler havuzdaki azalmayı da göz önünde bulundurmak gerekir. Çünkü Atilgan ve ark. (141) deneysel bir çalışmada özellikle sekonder folikül sayısının total salpenjektominin 1. ayında kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Aynı deneyde 6. ayın sonunda overlerini inceledikleri gruplarda ise tüm folikül sayılarının hem kontrol hem de salpenjektomi grubunda anlamlı bir farklılık göstermediğini tespit etmişlerdir. Fibrozis skorunun ise 1. aydaki ve 6. aydaki gruplarda kontrol grubuna göre salpenjektomi grubunda anlamlı olarak artmış olduğunu ve bunun 6. ayda da devam ettiğini göstermişlerdir.

Bu bulgu da bize yukarıda bahsedildiği gibi Souza ve ark. (151)'nin fibrozisin ovaryan rezervi korumaya yardım eden bir ovarian homeostazis mekanizmasının olduğu teorisini desteklemektedir. Folikül sayılarının farklı olmasında belki de overdeki parakrin etkileşimler de rol oynuyor olabilir. Çünkü Fu ve ark (156) mezenşimal kök hücre transplantasyonunun kemoterapinin neden olduğu ovaryan fonksiyon ve doku hasarının düzelmesinde önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir. Hasarlanan overlerin onarılmasında mezenşimal kök hücre tarafından sekrete edilen parakrin mediatörlerin rolünün olduğunu bildirmişlerdir. NAC ve benfotiamin verdiğimiz grupta ise sekonder folikül sayısında transplantasyon ve kontrol grubuna göre anlamlı fark bulamadık. Over rezervinin iyi bir belirtecinin sekonder folikül sayısı olduğu düşünülürse (AMH' nin başlıca salgılandığı folikül) NAC ve benfotiaminin transplantasyonun neden olduğu iskemi-reperfüzyon hasarına karşı en azından erken dönemde over rezervini koruduğunu söyleyebiliriz.

Oksidan/antioksidan sistemde, belirli bir düzeye kadar oluşan oksidan molekül artışı vücutta daima belirli bir seviyede bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Oksidanlar belirli düzeyin üzerinde oluşur veya antioksidanlar yetersiz olursa, oksidan moleküller organizmanın yapı elemanlarını tahrip ederek hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısını bozarak, hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler, DNA'yı tahrip ederler, mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozar ve hücrede zararlı etkilere yol açarlar (157). Hücrede radikallerin oluşumu birçok primer metabolit üzerinde güçlü etkili olup, kanser gibi hastalıkların patogenezinde rol almaktadırlar. Bu maddeler dışarıdan uygulandığında, organizma tarafından fark edilmekte ve organizma bu maddelere ve etkilerine karşı defans mekanizmaları geliştirmektedir. Daha sonra organizma bu maddelere karşı stres yönetiminde çevrili makromoleküllere zarar vermeden antioksidan enzimler bu serbest radikalleri temizlemek için aktive olmaktadır. Eğer bu radikaller hücreyi irreversible şekilde hasara uğratırsa hücre kendini yok etme seçeneğini kullanabilir ve apoptotik süreç başlayabilir (158). Reaktif oksijen türleri üzerine benfotiaminin inhibe edici etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (115, 116). Bir çalışmada da benfotiaminin diyabetli sıçanlardaki endotel hücrelerde fazla sayıda üretilmiş reaktif oksijen türlerini normalleştirdiği gösterilmişken (126), bir diğer çalışmada streptozotocin (STZ)

indüklemeli diyabetik farelerde de oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (127). NAC'ın oksidatif stresi azaltma ve iskemik reperfüzyon hasarında önemli rol oynayan TNF-a, IL-1b, iNOS ve NO üretimi gibi preinflamatuvar sitokinlerin indüksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (9). NAC ayrıca serbest oksijen radikallerinin temizlenmesi ve intraselüler glutatyon konsantrasyonunun artmasında önemli rol oynar (159). Deneyimizde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TAS düzeyleri transplantasyon grubunda belirgin derecede azalmış iken TOS düzeyleri ise belirgin olarak artmış idi. Bu bulgu da bize transplantasyonun over üzerindeki oksidan/antioksidan dengeyi oksidatif hasar yönünde bozduğunu göstermektedir. Transplantasyon grubu ile karşılaştırıldığında ise transplantasyon+NAC grubunda TAS seviyesi anlamlı olarak azalmış iken transplantasyon+benfotiamin grubunda ise azalmakla birlikte istatistiksel fark tespit edilmedi. Ancak kontrol ve transplantasyon +NAC grubu ile karşılaştırıldığında ise transplantasyon+benfotiamin grubunda TAS düzeyleri bakımından anlamlı fark yoktu. TOS ise transplantasyon grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış bulundu. Transplantasyon+benfotiamin ve transplantasyon+NAC gruplarında ise transplantasyon grubuna göre anlamlı olarak azalma tespit edildi. Transplantasyon+NAC ile transplantasyon+benfotiamin grupları arasında ise anlamlı fark yoktu. Bu bulgu da bize benfotiaminin özellikle TOS seviyesini azaltarak, NAC kadar iskemi-reperfüzyon hasarına karşı overi koruduğunu göstermektedir. Yani benfotiamin ve NAC oksidan/antioksidan dengeyi antioksidan lehine değiştirerek overi koruyucu etki yapmaktadır. Sapmaz ve ark (160) otolog intraperitoneal over transplantasyonu deneyinde bir antioksidan ajan olan melatoninin doku MDA düzeylerini düşürdüğünü ve ovaryan nekroza karşı etkili olduğunu göstermişlerdir. Biz de Sapmaz ve ark.'nın (160) bulgularına benzer olarak MDA'yı da içeren TOS seviyelerini transplantasyon+NAC ve transplantasyon +benfotiamin grubunda anlamlı olarak azalmış olduğunu gösterdik.

Over transplantasyonunda iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesi çözülmemiş en önemli konulardan birisidir (7). İskemi-reperfüzyon olaylarında ortaya çıkan oksijen radikalleri (süperoksit, hidroksil, peroksil, alkoksil ve singlet oksijen radikalleri) tüm membranlardaki lipitler üzerine yıkıcı etkiye neden olur. Bunlar içerisinde en etkilisi hidroksil radikalidir (161). Ortaya çıkan oksijen radikalleri ilk önce SOD, daha sonra katalaz ve GSH-Px tarafından temizlenir.

Oksijen radikal üretiminde bir artış meydana geldiğinde bu enzimler aşırı tüketilir ve göreceli bir yetmezlik ortaya çıkar. Sonuçta ortamdaki uzaklaştırılmayan oksijen radikallerinin özellikle membranlar üzerine hasar oluşturan etkileri ortaya çıkar ve hücreler nekroza uğrar (162-164). Transplant grubumuzda fibrozis ve apoptozisin kontrol grubuna göre fazla olmasını kronik hipoksinin apoptotik etkisine bağlamaktayız (165). Zira mikroskopik olarak incelediğimizde transplant grubunda diğer gruplara göre belirgin derecede nekroz alanlarının fazla olduğunu gördük. Bu nekroz alanlarının fazla olması ise TUNEL ile boyanacak hücre çekirdeği sayısının daha az olacağını göstermektedir. Yani burada apoptozisin çok farklı sonuçlanmaması dokuların korunduğu anlamına gelmemektedir. Benzer şekilde Atilgan ve ark. (141) yaptıkları deneyde total salpenjektominin neden olduğu iskemireperfüzyon hasarının foliküler granüloza hücrelerini olumsuz etkilediğini göstererek PCNA immünreaktivitesinin salpenjektomi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada apoptozis ve fibrozisin de salpenjektomi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir. Yani çalışmamızda transplantasyonun neden olduğu hipoksik süreç, overlerde çok ileri derecede zararlı etkiler yapmıştır diyebiliriz. Benfotiamin ve NAC verilen gruplarda ise apoptotik ve fibrotik ilerlemenin anlamlı olarak daha az olduğunu gösterdik. Bu bulgumuz da bize bu iki ajanın transplantasyonun neden olduğu total over harabiyetini önlemede etkin bir rol oynadığını göstermektedir.

Foliküler atrezi apoptozis aracılı bir süreçtir (166). Apoptozis, seçici hücre azaltıcı bir işlem olarak aktif gen ekspresyonuna gerek duyar. DNA fragmantasyonu, plazma membranında şişme ve hücrenin büzülmesi şeklinde biyokimyasal ve morfolojik belirtiler oluşturan bir süreçtir. Pek çok hormon, sitokinler ve büyüme faktörleri genelde dokuya spesifik koruma faktörleri olarak aktivite göstererek apoptozisi önüyor olsa da pek çok hormonal faktör de apoptotik süreci indükleyici ya da hızlandırıcı etki göstermektedir (167, 168). Apoptotik uyarım almış bir hücre tipik olarak büzülmemekte ve çevre hücrelerle bağlantısını kesmektedir (168). Primordiyal ve küçük çaplı gelişen folikülde oosit küçülür ve dejenere olur. Sonra benzer değişiklikler folikül hücrelerinde gözlenir. Hücreler sindirilip görünmez hale geldiğinde, etraftaki stromal hücreler oluşan boşluğa göç eder ve folikülden iz bırakmaz (169). Transplant grubumuzdaki TAS düzeylerindeki azalma, TOS

düzeyindeki artış DNA hasarı yaparak transplantasyon, transplantasyon+benfotiamin ve transplantasyon+NAC grubunda primordiyal foliküllerdeki apoptozisi hızlandırmaktadır.

Deneyimizde dikkat çeken bir diğer bulgu, inflamatuvar hücre sayısının transplantasyon grubunda kontrol, transplantasyon+NAC ve transplantasyon+benfotiamin grubuna göre ileri dercede artmış olmasıydı. Bu nedenle NAC'ın antiinflamatuvar ve antioksidan etkisinin yanısıra hücre yüzeyindeki tiyol proteinlerin fonksiyonunu azaltarak ve apoptozisi inhibe ederek iskemik reperfüzyon hasarını azalttığı söylenebilir (170, 171). NAC tedavisi sonrası rat kalp izograft (171) ve insan böbrek greft (170) fonksiyonunun daha iyi ve hızlı düzeldiğini gösteren araştırmacılar, östrus döngüsü ve yumurtalık fonksiyonunun da daha hızlı toparlandığını göstermişlerdir. Vitamin E (172), allopurinol (173), askorbik asit (174), melatonin ve oksitetrasiklin (160) gibi diğer antioksidanların overyan doku transplantasyonunda potansiyel yararları bildirilmiştir. Son zamanlarda Benfotiamine nin makrofajlarda LPS-kaynaklı NF-kB-bağımlı inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu engellediği gösterilmiştir (175). Ayrıca bizde çalışmamızda benfotiaminin de inflamatuvar yanıtı baskıladığını göstermiş olduk.

İnsanlarda reproduktif alandaki umut verici sonuçlarına rağmen, dondurulmuş over transplantasyonu halen daha ileri çalışmalara ihtiyaç duymaktadır. Günümüzde otolog over transplantasyonu sonucu kendiliğinden gebelik elde edilen bazı vakalar vardır (176). İlk spontan gebelik Donnez ve ark. (177) tarafından bildirilmiştir. Ancak öncelikle greftin kısa ömürlü olması hatta hormonal stimülasyonla bile gebelik elde edilememesi ile ilgili başarısızlık üzerine birçok görüş vardır. Fertilitenin yeniden kazanılmasını engelleyen ve transplantasyonu takiben gelişen iskemi ve fibrozis, folikül popülasyonundaki kayıp, fertilitenin yeniden kazanılmasının önündeki engeldir (178-180). Özellikle posttransplantasyonun en son fazlarında taze greftlenen overin fonksiyonunu devam ettirebilmesi için iskemik koşulların ortadan kaldırılmasının faydalı etkiler gösterdiğini bildirmişlerdir. Salpenjektominin bile deneysel çalışmalarda bu derece overi etkilediği düşünülürse, overin tüm kan desteğinin bir süreliğine ortadan kaldırıldığı ve tamamen kendi kompensasyon mekanizmaları ile başbaşa bırakıldığı transplantasyon işleminde, overyan dokunun uğrayacağı hasarın ne derece büyük olabileceğini tahmin etmek zor

olmayacaktır. Deneysel sonuçlarımızla bu hasarların şiddetini ve iskemi-reperfüzyon hasarının etkin bir biçimde önüne geçilmesinin ise dokuları korumada son derece önemli olduğunu da bir kere daha gösterdik. İskemi reperfüzyon-hasarını azaltmanın ovaryan dokuyu belirgin derecede koruduğunu, NAC ve benfotiaminin ise iskemi-reperfüzyon hasarından overleri etkin bir şekilde koruyabileceğini de tecrübe ettik.

Sonuç olarak ratlarda yaptığımız otolog intraperitoneal over transplantasyonunda iskemi-reperfüzyon hasarına karşı ovaryan dokuyu korumada benfotiamin ve NAC eşit derecede ve etkili iki ajandır.



## 5. KAYNAKLAR

1. Callejo J, Jauregui MT, Valls C, Fernandez ME, Cabre S, Lailla JM. Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats: six-month control of estradiol and follicle-stimulating hormone concentrations after intraperitoneal and subcutaneous implants. *Fertil Steril* 1999; 72: 513-7.
2. Marmor D. Fertility after antimitotic treatments. *Bull Cancer* 1994; 81: 764-769.
3. Bidzinski M, Lemieszczuk B, Zielinski J. Evaluation of the hormonal function and features of the ultrasound picture of transposed ovary in cancer patients after surgery and pelvic irradiation. *Eur J Gynaecol Oncol* 1993; 14: 77-80.
4. Cohen I, Speroff L. Premature ovarian failure: update. *Obstet Gynecol Surv* 1991; 46: 156-62.
5. Kim SS, Soules MR, Battaglia DE. Follicular development, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation. *Fertil Steril* 2002; 78: 77-82.
6. Skaznik WME, Sharma RK, Selesniemi K, Lee HJ, Tilly JL, Falcone T. Granulocyte colony-stimulating factor in conjunction with vascular endothelial growth factor maintains primordial follicle numbers in transplanted Mouse ovaries. *Fertil Steril* 2011; 95: 1405-1409.
7. Kim SS, Battaglia DE, Soules MR. The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. *Fertil Steril* 2001; 75: 1049-1056.
8. Damous LL, Silva SM, Carbonel AP, Simoes RS, Simoes MJ, Montero EF. Effect of remote ischemic preconditioning on rat estradiol serum levels and follicular development after ovarian transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41: 830-833.
9. Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C, et al. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J Neurosci Res* 2004; 76: 519-527.
10. Usta U, Inan M, Erbas H, Aydogdu N, Ozpuyan F, Altaner S. Tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: effects of L-carnitine and N-acetylcysteine. *Pediatr Surg Int* 2008; 24: 567-573.

11. Hirayama Y, Inoue K, Suzuki H. Effect of intraperitoneal administration of desialylated erythropoietin on the follicular survival in cryopreserved canine ovaries after xenotransplantation. *J Mamm Ova Res* 2011; 28: 143–147.
12. Kim SS. Timetore-think: ovarian tissue transplantation versus whole ovary transplantation. *Reprod Biomed Online* 2010; 20: 171–174.
13. Y BP. Cellular defences against damage from oxygen species. *Physical Rev* 1994; 74: 139-62
14. Martinez CM. Oxygen free radicals and human disease. *Broch* 1995; 77: 147-161.
15. Aydogdu N, Kaymak K, Yalçın Ö. Sıçanlarda Böbrek iskemisi/Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin Etkileri. *Fırat Tıp Dergisi* 2005; 10: 151-155.
16. Hammes HP, Du X, Edelstein D. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* 2003; 9: 294-299.
17. Babaei-Jadidi R, Karachalias N, Ahmed N, Battah S, Thornalley PJ. Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes* 2003; 52: 2110-2120.
18. Anonymous <http://www.mwt.net/~drbrewer/benfotiamine.htm/> 21.05.2010 Erişim Tarihi: 24.05.2016
19. Yıldırım M. *Klinik Jinekoloji*. Ankara: Yargıçoğlu yay. 1992: 1-8.
20. Junqueira LC, *Temel Histoloji*. Aytekin Y, Solakoğlu S (Çeviren) s.458-463. *Uterus histolojisi*. 10. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul 2006; 458-463.
21. Abraham L. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi* Prof.Dr. Ramazan Demir (çeviri editörü) Palme yay. Ankara 2006: 1-43
22. Berek SJ. *Novak Jinekoloji*. Onüçüncü Baskı. İstanbul: Nobel Yayınevi, 2004: 164-169.
23. Clement PB. *Anatomy and Histology of the Ovary*. Kurman R (Ed). Blaustein's *Pathology of the Female Genital Tract*, 5th ed. New York: Springer-Verlag, 2002: 649-650.

24. Clement PB. Histology of the Ovary. Sternberg SS (Ed). Histology for pathologists, 2nd ed. New York: Lippincott-Raven, 1997: 929-959.
25. Reeves G. Specific stroma in the cortex and medulla of the ovary. Cell types and vascular supply in relation to follicular apparatus and ovulation. *Obstet Gynecol* 1971; 37.
26. Kamina P. L'Ovaire Anatomie gynécologique et obstétricale. Maloine 1974: 193–221.
27. <http://academic.amc.edu/martino/grossanatomy/site/Medical/CASES/> Erişim tarihi 24.05.2016
28. Martini FH, Welch K. Fundamentals of Anatomy and Physiology, 5th edition Medicine & Health Sciences, 2001: 233-237.
29. Sadler TW, Langman's Medikal Embriyolojisi. Başaklar AC, Sönmez K (Çev), s.1-20. 7. Basım, İstanbul: Palme Yayıncılık, 2007.
30. Kierszenbaum LA. Histology and Cell Biology. 3rd Editon. Mosby Elsevie Medicine & Health Science, 200: 565-567.
31. Karabulut O, Delilbaşı L, Oogenezis, Oosit Toplama Prosedürü, Oosit Morfolojisi in vitro Maturasyon. Delilbaşı L (Ed). IVF Laboratuar Yöntemleri, 2007: 85-86
32. Erkoçak A. Özel Histoloji. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, 1982: 42-46.
33. Gartner LP, Hiatt J. Colour text book of histology. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997: 458.
34. Özfiliz N. Histolojib Bursa: Uludag Üniversitesi Yayınları, 1986: 565.
35. Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle MR. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Rep Biolog Endocrinol* 2005; 3: 1-13.
36. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mamalian ovary, *Nature* 2004; 428: 145-150.
37. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R (Çev.), s.618-619. Ankara: Palme Yayıncılık, 2006.

38. Eroschenko VP. Di Fiore Histoloji Atlası. Demir R (Çev.) s.366-367. Ankara: Palme Yayıncılık, 2001; 366.
39. Esrefoglu M. Genel ve Özel Histoloji. Ankara: Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık, 2004: 356.
40. Fawcett DW. Bloom and fawcett: concise histology. Secand ed. U.S.A: Chapman And Hall, 1997: 964.
41. Solomon EP. İnsan Anatomisi ve Fiziyojisine Giriş. Süzen LB (Çev.) s.274. İstanbul: Birol Basın Yayın Dagıtım, 2000.
42. Themmen APN. Anti-Müllerian hormone: its role in follicular growth initiation and survival and as an ovarian reserve marker. J Natl Cancer Inst 2005; 34: 18–21.
43. <http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html> Erişim tarihi 24.05.2016.
44. Delilbaş L. In Vitro Fertilizasyon (IVF) Labaratuvar Yöntemleri. Birinci Baskı, İstanbul: Güneş Tıp Kitabevi, 2008.
45. Colgar U. In PCOS ve İnfertilite. İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2006,
46. <https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/humandev/answers>. Erişim tarihi 24.05.2016.
47. [http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201\\_mckinley](http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley)
48. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO, Temel Histoloji. Aytekin Y (Çeviren) s.307-319 Barış Kitabevi, 1995.
49. Kahraman S, Yakın K. Ovulasyon İndüksiyonu, İstanbul: Esin Ofset, 2000: 24: 101.
50. Tremellen KP, Kolom GA, Lekam DN. Anti-mullerian hormone as a marker of ovarian reserve. Aust Nz j Obstet Gynaecol 2005; 45: 20-24.
51. Cevrioğlu S. Ovaryan Rezerv Testleri. Çiçek MN, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A (eds). Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. 2. Baskı. Ankara-İstanbul: Güneş Kitabevi Ltd Şti, 2006: 1427-1432.

52. Hendriks DJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, Looman W, de Jong FH, te Velde ER. Single and repeated GnRH agonist stimulation tests compared with basal markers of ovarian reserve in the prediction of outcome in IVF. *J Assist Reprod Genet* 2005; 22: 65-73.
53. Bukman A, Heineman MJ. Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Hum Reprod* 2001; 7: 581-590.
54. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992; 7: 1342-1346.
55. McKinlay SM, Brambilla DJ, Posner JG. The normal menopausal transition. *Maturitas* 1992; 14: 103-115.
56. Tanbo T, Dale P O, Lunde O, Norman N. Prediction of response to controlled ovarian hyperstimulation: a comparison of basal and clomiphene citrate-stimulated folliclestimulating hormone levels. *Fertil Steril* 1992; 57: 819-824.
57. Scott RT, Hofmann GE, Oehninger S, Muasher SJ. Intercycle variability of day 3 FSH levels and its effect on stimulation quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990; 54: 297-302.
58. Toner JP, Philput CB, Jones GS, Muasher SJ. Basal FSH level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. *Fertil Steril* 1991; 55: 784-791.
59. Magoffin DA, Jakimiuk AJ. Inhibin A, inhibin B and activin A in the follicular fluid of regularly cycling women. *Hum Reprod* 1997; 12: 1714-1719.
60. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R. Measurement of dimeric inhibinB throughout the human menstrual cycle. *Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1401-1405.
61. Picard JY, Josso N. Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol Cell Endocrinol* 1984; 34: 23-29.
62. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev* 2001; 22: 657-674.

63. Picard JY, Benarous R, Guerrier D, Josso N, Kahn A. Cloning and expression of cDNA for anti-müllerian hormone. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83: 5464-5468.
64. Picon R. Action of the fetal testis on the development in vitro of the Müllerian ducts in the rat. *Arch Anat Microse Morphol Exp* 1969; 58: 1-19.
65. Gruijters MJ, Visser JA, Durlinger AL, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 211: 85-90.
66. Lass, A, Brinsden P. The role of ovarian volume in reproductive medicine. *Hum Reprod Update* 1999; 5: 256- 266.
67. Andolf E, Jørgensen C, Svalenius E. Ultrasound measurement of ovarian volume. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1987; 66; 387- 389.
68. Reuss ML, Kline J, Santos R. Age and ovarian follicle pool assessed with transvaginal ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol* 196; 174: 624-627.
69. Chang MY, Chiang CH, Hsieh TT. Use of antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive Technologies. *Fertil Steril* 1998; 69: 505-510.
70. Pan HA, Cheng YC, Li CH. Ovarian stromal flow intensity decreased by age: a three dimensional power doppler ultrasonography. *Ultrasound Med Biol* 2002; 28: 425-430.
71. Lass A, Sitle R, Abrams DC. Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve. *Hum Reprod* 1997; 12: 1028- 1031.
72. Speroff L, Glass NH, Kase RG. *Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility*. 6 th edition. 1999; 84: 171-213.
73. Loumaye E, Billion JM, Mine JM. Prediction of individual response to controlled ovarian hyperstimulation by means of clomiphene citrate challenge test. *Fertil Steril* 1990; 53: 295-301.
74. Winslow KL, Toner JP, Brzyski RG, Oehninger S. The gonadotropin releasing hormone agonist stimulation test-a sensitive predictor of performance in the flare up in vitro fertilization cycle. *Fertil Steril* 1991; 56: 711-717.

75. Padilla SL, Bayati J, Garcia JE. Prognostic value of the early serum estradiol response to leuprolide acetate in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1993; 59: 587-595.
76. Fanchin R, de Ziegler D, Olivennes F. Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT): a simple and reliable screening test for detecting poor responders in in- vitro fertilization. *Hum Reprod* 1994; 9: 1607-1611.
77. Mazaud S, Guigon CJ, Lozach A, Coudouel N, Forest MG, Coffigny H. et al. Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology* 2002; 143: 4775-4787.
78. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21: 200-214.
79. Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E, Sanchez-Criado JE. Ovarian Follicle Macrophages: Is Follicular Atresia in the Immature Rat a Macrophage-Mediated Event? *Biol Reprod* 1998; 58: 52-59.
80. Allen E. The oestrous cycle in the Mouse. *Amer J Anat* 1922; 30: 297-371.
81. Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CH. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J Mice: I. Cycle frequency, Length and vaginal cytology. *Biol Reprod* 1982; 27: 327-339.
82. Safranski TJ, Lamberson WR, Keisler DH. Correlations among three measures of puberty in mice and relationships with estradiol concentration and ovulation. *Biol Reprod* 1993; 48: 669-673.
83. Snell GD. Reproduction. Snell GD (Ed). *Biology of Mouse*. Second edition. USA: Dover Publications 1956: 55-89.
84. Petroianu A, Vasconcellos LS, Alberti LR, Nunes MB. The influence of venous drainage on autologous ovarian transplantation. *J Surg Res* 2005; 124: 175-179.
85. Champlin AK, Dorr DL. Determining the stage of the estrous cycle in the Mouse by the appearance of the vagina. *Biol Reprod* 1973; 8: 491-494.

86. Rao RP, Kaliwal BB. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. *Ind Health* 2002; 40: 237-244.
87. Campbell CS, Ryan KD, Schwartz NB. Estrous cycles in the Mouse: relative influence of continuous light and the presence of male. *Biol. Reprod* 1976; 14: 292-299.
88. Spornitz UM, Socin CD, Dravid AA. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *Anat Rec* 1999; 254: 116- 126.
89. Bayer AI, Wiskind AK. Adnexal Torsion: can the adnexa be saved? *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 1506-1510.
90. Geier DA. "L-Cysteine, N-acetyl-Compound Summary". PubChem Compound. USA: National Center for Biotechnology Information. 25 March 2005. Identification. Retrieved 9 January 2012
91. Ziment I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother* 1988; 42: 513-519.
92. Stewart S, Ryan C, Poropat S. Managing patients with acute myocardial ischemia and reperfusion injury with N-acetylcysteine. *Dimens Crit Care Nurs* 1997; 16: 122-31.
93. Moldeus P, Cotgreave IA, Berggren M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration* 1986; 50: 31-42.
94. van Zandwijk N. N-acetylcysteine for lung cancer prevention. *Chest* 1995; 107: 1437-1441.
95. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid *Free Radic Biol Med* 1989; 6: 593-597.
96. van Herwaarden CL, Bast A, Dekhuijzen PN. The role of N-acetylcysteine in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Neth J Med* 1995; 47: 45-8
97. De Flora S, Grassi C, Carati L. Attenuation of influenza-like symptomatology and improvement of cell-mediated immunity with long-term N-acetylcysteine treatment. *Eur Respir J* 1997; 10: 1535-1541.

98. Travaline JM, Sudarshan S, Roy BG, Cordova F, Leyenson V, Criner GJ. Effect of N-acetylcysteine on human diaphragm strength and fatigability. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1567-1571
99. Holdiness MR. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clin Pharmacokinet* 1991; 20: 123-34.
100. Spapen H, Zhang H, Demanet C, Vleminckx W, Vincent JL, Huyghens L. Does N-acetylcysteine influence cytokine response during early human septic shock? *Chest* 1998; 113: 1616-24.
101. Vale JA, Proudfoot AT. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Lancet* 1995; 346: 547-52.
102. Walsh TS, Lee A. N-acetylcysteine administration in the critically ill. *Intensive Care Med* 1999; 25: 432-434.
103. Wong JW, Ebeler SE, Rivkah-Isseroff R, Shibamoto T. Analysis of malondialdehyde in biological samples by capillary gas chromatography. *Anal Biochem* 1994; 220: 73-81.
104. Thornalley PJ. The potential role of thiamine (vitamin B (1)) in diabetic complications. *Curr Diab Rev* 2005; 1: 287–298.
105. Malecka SA, Poprawski K, Bilski B. Prophylactic and therapeutic application of thiamine (vitamin B1)—a new point of view. *Wiad Lek* 2006; 59: 383–387.
106. Fujiwara M, Watanabe H, Matsui K. Allithiamine, a newly found derivative of vitamin B1. *J Biochem* 1954; 41: 29–39.
107. Bitsch R, Wolf M, Moller J, Heuzeroth L, Gruneklee D. Bioavailability assessment of the lipophilic benfotiamine as compared to a water-soluble thiamine derivative. *Ann Nutr Metab* 1991; 35: 292–296.
108. Yadav UCS, Subramanyam S, Ramana KV. Prevention of endotoxin-induced uveitis in rats by benfotiamine, a lipophilic analogue of vitamin B1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 2276–2282.

109. Loew D. Pharmacokinetics of thiamine derivatives especially of benfotiamine *Int J Clin Pharmacol Ther* 1996; 34: 47-50.
110. Hilbig R, Rahmann H. Comparative autoradiographic investigations on the tissue distribution of Benfotiamine versus thiamin in mice. *Arzneimittelforschung* 1998; 48: 461–468.
111. Shoeb M, Ramana KT. Anti-inflammatory effects of benfotiamine are mediated through the regulation of the arachidonic acid pathway in macrophages. *Free Radical Biology & Medicine* 2012; 52: 182-190.
112. Sánchez-Ramírez GM, Caram-Salas NL, Rocha-González HI. Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 530: 48–53.
113. Balakumar P, Rohilla A, Krishan P, Solairaj P, Thangathirupathi A. The multifaceted therapeutic potential of benfotiamine *Pharmacological Research* 2010; 61: 482–488.
114. Volvert ML, Seyen S, Piette M. Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives. *BMC Pharmacol* 2008; 8: 10.
115. Gadau S, Emanuelli C, Linthout SV. Benfotiamine accelerate the healing of ischaemic diabetic limbs in mice through protein kinase B/Akt-mediated potentiation of angiogenesis and inhibition of apoptosis. *Diabetologia* 2006; 49: 405–20.
116. Marchetti V, Menghinni R, Rizza S. Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/FOXO signaling. *Diabetes* 2006; 55: 2231–2237.
117. Pomero F, Molinar Min A, La Selva M. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. *Acta Diabetol* 2001; 38: 135-138.
118. Bakker SJ, Heine RJ, Gans RO. Thiamine may indirectly act as an antioxidant. *Diabetologia* 1997; 40: 741-742.
119. Pomero F, Molinar Min A, La Selva M. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. *Acta Diabetol* 2001; 38: 135-138.

120. Bakker SJ, Heine RJ, Gans RO. Thiamine may indirectly act as an antioxidant. *Diabetologia* 1997; 40: 741-742.
121. Hsu GM, Chow BF. Effect of thiamine deficiency on glutathione contents of erythrocytes and tissues in rat. *Proc Soc Exp Bio Med* 1960; 104: 178-180.
122. Beltramo E, Berrone E, Buttiglieri S, Porta M. Thiamine and benfotiamine prevent increased apoptosis in endothelial cells and pericytes cultured in high glucose. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20: 330-336
123. Winkler G, Pal B, Nagybeganyi E. Effectiveness of different benfotiamine dosage regimens in the treatment of painful diabetic neuropathy, *Arzneimittelforschung* 1999; 49: 220–224.
124. Sánchez-Ramírez GM, Caram-Salas NL, Rocha-González HI. Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 530: 48–53.
125. Shim JB, Yang DY, Han YK. Effect of Benfotiamine in Expression of Phosphodiesterase 5 and Isoforms in Type 2 Diabetic Rat Kidney. *Korean J Androl* 2010; 28: 93-99.
126. Hammes HP, Du X, Edelstein D. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* 2003; 9: 294-299.
127. Wu S, Ren J. Benfotiamine alleviates diabetes-induced cerebral oxidative damage independent of advanced glycation end-product, tissue factor and TNF- $\alpha$ . *Neurosci Lett* 2006; 394: 158-162.
128. Yadav UCS, Subramanyam S, Ramana KV. Prevention of endotoxin-induced uveitis in rats by benfotiamine, a lipophilic analogue of vitamin B1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 2276–2282.
129. Balakumar P, Rohilla A, Krishan P, Solairaj P, Thangathirupathi A. The multifaceted therapeutic potential of benfotiamine. *Pharmacol Res* 2010; 61: 482–488,
130. Gadau S, Emanuelli C, Linthout SV. Benfotiamine accelerates the healing of ischaemic diabetic limbs in mice through protein kinase B/Akt-mediated potentiation of angiogenesis and inhibition of apoptosis. *Diabetologia* 2006; 49: 405–420.

131. Ceylan-Isik AF, Wu S, Li Q, Li SY, Ren J. High-dose benfotiamine rescues cardiomyocyte contractile dysfunction in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Appl Physiol* 2006; 100: 150–156.
132. Woelk H, Lehrl S, Bitsch R, Kopcke W. Benfotiamine in treatment of alcoholic polyneuropathy: an 8-week randomized controlled study (BAP I study). *Alc Alc* 1998; 33: 631–638.
133. Balakumar P, Kaur T, Singh M. Potential target sites to modulate vascular endothelial dysfunction: current perspectives and future directions. *Toxicology* 2008; 245: 49–64
134. Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, Porta M. Different apoptotic responses of human and bovine pericytes to fluctuating glucose levels and protective role of thiamine. *Diab Metab Res Rev* 2009; 25: 566–576.
135. Oishi K, Barchi M, Au AC, Gelb BD, Diaz GA. Male infertility due to germ cell apoptosis in mice lacking the thiamin carrier, *Tht1*. A new insight into the critical role of thiamin in spermatogenesis. *Dev Biol* 2004; 266: 299–309.
136. Onodera K, Kisara K, Okabe H, Ogura Y. Studies on the effects of thiamine deficiency on rat testes. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1980; 76: 143– 152.
137. Gangolf M, Czerniecki J, Radermecker M. Thiamine status in humans and content of phosphorylated thiamine derivatives in biopsies and cultured cells. *Plos One* 2010; 5: 1361-1366.
138. Lonsdale D. A Review of the Biochemistry, Metabolism and Clinical Benefits of Thiamin (e) and Its Derivatives Advance Access Publication 2006; 3: 49–59.
139. Oriol B, Barrio A, Pacheco A, Serna J, Zuzuarregui JL, Garcia-Velasco JA. Systemic methotrexate to treat ectopic pregnancy does not affect ovarian reserve. *Fertil Steril* 2008; 90: 1579–1582.
140. Chan CC, Ng EH, Li CF, Ho PC. Impaired ovarian blood flow and reduced antral follicle count following laparoscopic salpingectomy for ectopic pregnancy. *Hum Reprod* 2003; 18: 2175–2180.

141. Atilgan R, Çelik A, Sapmaz E. Unilateral Total Salpenjektominin Over Histopatolojisi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi: Deneysel Çalışma Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst 2005; 15: 235-42.
142. Jassem W, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. *Kidney Int* 2004; 66: 514–517.
143. Ulug P, Gökalp Ö. Evaluation of the effects of single or multiple dose methotrexate administration, salpingectomy on ovarian reserve of rat with the measurement of anti-Mullerian hormone (AMH) levels and histological analysis *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014; 181: 205-9.
144. Anzalone CR, Hong LS, Lu JK, LaPolt PS. Influences of age and ovarian follicular reserve on estrous cycle patterns, ovulation, and hormone secretion in the Long-Evans rat. *Biol Reprod* 2001; 64: 1056-1062.
145. Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM, Gosden RG. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196C. *Endocrinology* 1999; 140: 462–471.
146. Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J, Motta P, Donnez J: Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril* 2000; 74: 122–129.
147. Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Gadisseux E, Guiot Y, Yuan WY, Torre A, et al. Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. *Reproduction* 2007; 134: 253–262.
148. Schubert B, Canis M, Darcha C, Artonne C, Smitz J, Grizard G: Follicular growth and estradiol follow-up after subcutaneous xenografting of fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril* 2008; 89: 1787–1794.
149. Nottola SA, Camboni A, Van Langendonck A, Demylle D, Macchiarelli G, Dolmans MM, et al. Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. *Fertil Steril* 2008; 90: 23–32.
150. Ross GT, Schreiber JR. The ovary, reproduction endocrinology. Yen SSC, Jaffe RB, (ed.) 9. Edt. Philadelphia: Saunders, 1979: 63-79.

151. Souza AZ, Fonseca AM, Izzo VM, Clauzet RM, Salvatore CA. Ovarian histology and function after total abdominal hysterectomy. *Obstet Gynecol* 1986; 68: 847-849.
152. Barber HRK. Anatomy, embryology, and comparative anatomy. *Ovarian Carcinoma: Etiology, Diagnosis and treatment*. Edited by HRK Barber. New York: Masson, 1978: 13-27.
153. Mazaud S, Guigon CJ, Lozach A, Coudouel N, Forest MG, Coffigny H, et.al. Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology* 2002; 143: 4775-4787.
154. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21: 200-214.
155. Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E, Sanchez-Criado JE. Ovarian follicle macrophages: is follicular atresia in the immature rat a macrophage-mediated event? *Biol Reprod* 1998; 58: 52-59.
156. Fu X, He Y, Xie C, Liu W. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. *Cytotherapy*. 2008; 10: 353-363.
157. Halliwell B. Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91: 14-21.
158. Miraz M, Malinova K, Kotaskova J, Pavlova S, Tichy B, Malcikova J, et al. MiR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia* 2009; 23: 1159–1163.
159. Araujo M, Andrade L, Coimbra TM, Rodrigues AC, Seguro AC. Magnesium supplementation combined with N-acetylcysteine protects against Postischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3339–3349.
160. Sapmaz E, Ayar A, Celik H, Sapmaz T, Kilic N, Yasar MA. Effects of melatonin and oxytetracycline in autologous intraperitoneal ovary transplantation in rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; 24: 350-354.

161. Richard MJ, Arnaud J, Jurkovitz C, Hachache T, Meftahi H, Laporte F, et al. Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1991; 57: 10-15.
162. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB, Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78: 651-655.
163. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; 81: 637-647.
164. Ferrara N, Frantz G, LeCouter J. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am J Pathol* 2003; 162: 1881-1893.
165. Tanaka T, Hanafusa N, Ingelfinger JR. Hypoxia induces apoptosis in SV40-immortalized rat proximal tubular cells through the mitochondrial pathways, devoid of HIF1-mediated upregulation of Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 222-231.
166. Braw RH, Tsafiriri A. Follicles explanted from pentobarbitone-treated rats provide a model for atresia. *J Reprod Fertil* 1980; 59: 259-265.
167. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *European J Endocrinol* 1998; 138: 482-491.
168. Tomatır AG. Apoptoz: programlı hücre ölümü. *T Klin J Med Sci* 2003; 23: 499-508.
169. Michael HR, Edward JR, Lynn JR. *Female Reproductive System. histology: a text and atlas*. 2. ed. USA: Williams&Wilkins, 1989: 649-62.
170. Danilovic A, Lucon AM, Srougi M, Shimizu MH, Ianhez LE, Nahas WC, Seguro, AC. Protective effect of N-acetylcysteine one early out comes of decess adrenal transplantation. *Transplant Proc* 2011; 43: 1443-1449.
171. Mei J, Zhu J, Ding F, Bao C, Wu S. N-acetylcysteine improves early cardiac isograft function in a rat heterotopic transplantation model. *Transplant Proc* 2009; 41: 3632-3636.

172. Abir R, Fisch B, Jessel S, Felz C, Ben-Haroush A, Orvieto R. Improving post transplantation survival of human ovarian tissue by treating the host and graft. *Fertil Steril* 2011; 95: 1205-1210.
173. Abedi R, Eimani H, Pashae RS, Eftekhari P, Shahverdi AH, Mokhber ME. Evaluation effects of allopurinol and FSH on reduction of ischemia–reperfusion injury and on preservation of follicle after heterotopic auto-transplantation of ovarian tissue in mouse. *Reprod Med Biol* 2014; 13: 29–35.
174. Kim SS, Yang HW, Kang HG, Lee HH, Lee HC, Ko DS, Gosden RG. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril* 2004; 82: 679–685.
175. Yadav UC, Kalariya NM, Srivastava SK, Ramana KV. Protective role of benfotiamine, a fat-soluble vitamin B1 analogue, in lipopolysaccharide-induced cytotoxic signals in murine macrophages. *Free Radic Biol Med* 2010; 48: 1423–1434.
176. Smitz J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, et al. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum Reprod Update* 2010; 16: 395–414.
177. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Live birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 364: 1405–1410.
178. Lieberman B. Function of ovarian tissue after long-term storage. *Reprod Biomed Online* 2012; 25: 96–97.
179. Labied S, Delforge Y, Munaut C, Blacher S, Colige A, Delcombel R, et al. Isoform 111 of vascular endothelial growth factor (VEGF111) improves angiogenesis of ovarian tissue xenotransplantation. *Transplantation* 2013; 95: 426–433.
180. Damous LL, Silva SM, Carbonel AA, Simões MJ, Baracat EC, Montero EF. Progressive evaluation of apoptosis, proliferation, and angiogenesis in fresh rat ovarian autografts under remote ischemic preconditioning. *Reprod Sci* 2016; 23: 803-811.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Elazığ'da doğdum. İlkokulu Yazıkonak 8 Evler ilkokulunda okudum. Ortaokulu Atatürk ortaokulunda ve liseyi Balakgazi lisesi yabancı dil ağırlıklı bölümünde okudum. Tıp fakültesini Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesinde okudum. Mezun olduktan sonra mecburi hizmetimi Tunceli 'de yaptım. Daha sonra 2012'de yapılan Tıpta Uzmanlık Sınavı sonucu Fırat Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD'da araştırma görevlisi olarak göreve başladım. Halen bu birimde çalışmaya devam etmekteyim.

